

Entwicklung einer vierdimensionalen Trennmethode für die Analyse komplexer Proben

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES EINES

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

– DR. RER. NAT. –

VORGELEGT VON

SUSANNE STEPHAN (GEB. GIESE)

GEBOREN AM 07.10.1987

IN RATINGEN

ANGEWANDTE ANALYTISCHE CHEMIE

FAKULTÄT CHEMIE DER UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN

CAMPUS ESSEN

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2013 bis Mai 2016 im Arbeitskreis von Prof. Dr. O.J. Schmitz in der Angewandten Analytischen Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 01.12.2016

Gutachter: Prof. Dr. Oliver. J. Schmitz

PD Dr. Ursula Telgheder

Prof. Dr. Heiko Hayen

Vorsitzender: PD Dr. Holger Somnitz

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Entwicklung einer vierdimensionalen Trennmethode
für die Analyse komplexer Proben“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, 25.05.2016

Susanne Stephan

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Oliver J. Schmitz für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe der Angewandten Analytischen Chemie, die interessante Aufgabenstellung mit der Möglichkeit, die modernsten analytischen Instrumente im Labor selbständig zu nutzen, und die stetige Unterstützung.

Frau PD Ursula Telgheder danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Außerdem danke ich Agilent Technologies für die Bereitstellung einer zusätzlichen HPLC-Pumpe und die vielfältige Unterstützung bei der Anwendung von Geräten und Software. Insbesondere Herrn Joachim Thiemann und Herrn John Fjeldsted danke ich für die Beantwortung vieler Fragen zur Aufnahme und Auswertung von IMS-Daten.

Für die Bereitstellung von HPLC-Säulen bedanke ich mich bei Phenomenex.

Standards für den Aufbau einer CCS Datenbank wurden von vielen Seiten zur Verfügung gestellt. Dafür möchte ich mich bei Juri Leonhardt vom Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V., bei Susanne Brüggem vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW, dem Arbeitskreis Prof. Scriba der Fakultät für Biologie und Pharmazie, Universität Jena, den Arbeitskreisen für Instrumentelle Analytische Chemie sowie Prof. Meyer am Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen, dem Arbeitskreis Prof. Hayen am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Münster sowie dem Chemische Veterinär- und Untersuchungsamt Münster bedanken. Insbesondere Ahmad Deeb vom Arbeitskreis für Instrumentelle Analytische Chemie danke ich für die Vorbereitung und Bereitstellung der komplexen Abwasserprobe.

Danken möchte ich auch Timo Köhler, Robert Kalnins, Simon Schade und Christian Lipok, die in Bachelor- und Masterarbeiten durch fleißiges Messen und Auswerten entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem gesamten Arbeitskreis der Angewandten Analytischen Chemie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanke ich mich bei Jörg Hippler für den unermüdlichen Einsatz beim Programmieren der Datenbank, viele gute Ideen und das Korrekturlesen der Arbeit, Pia Rosendahl und

Duxin Li für konstruktive Diskussionen sowie Maria Madani für die große Hilfsbereitschaft.

Außerdem bin ich meinem Mann Christoph für seine stetige Unterstützung und sein Verständnis sowie das kritische Korrekturlesen der Arbeit sehr dankbar.

Meiner Familie danke ich, dass sie immer wieder auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt.

Abstract

In the work presented here, an analytical separation method in four dimensions (2D-LC, IMS and MS) was developed, which allows, in combination with a database containing CCS-values established here as well, non-target analysis of complex samples. For this purpose, methods for the measurement of CCS with IM-qTOF-MS were determined and their reproducibility was checked. More than 500 standard substance have been measured and CCS of their different adduct ions were calculated and merged in a database software. Furthermore, CCS-values of lipids, including different classes, have been determined. The possibility of IM-qTOF-MS to separate isobaric structures and to differentiate between them according to their CCS was examined. It was found that some constitutional isomers can be separated properly, but that for some others, especially in smaller molecules, differences in their structure are too slight to obtain enough difference in ion mobility drift times. Additionally, it was shown that isobaric separation in IMS depends on the kind of adduct ion. The second part of this work is concerned with HPLC-IM-qTOF-MS analysis of real samples. Examples of lemon juice show the separation of coeluting isobaric compounds in the IM dimension and how CCS values can help to identify peaks with the same exact mass. Therefore, more information are gained compared to a conventional HPLC-MS measurement. After the analysis of orange juice samples, a principal component analysis for evaluation of complex data sets and differentiation of two sample groups was carried out. The CCS database established before can be used for identification of compounds in complex samples, which is shown for a plant extract from *Castanea sativa* and two samples containing lipids. Based on these results, a two-dimensional HPLC method (LC+LC) suitable for coupling to the IM-qTOF-MS system was developed. Using a long modulation time of four minutes, it could be achieved that analytes are not or only one time modulated. This enables data visualization and evaluation with currently available software. The four-dimensional separation method (LC+LC-IM-qTOF-MS) was shown to have good reproducibility regarding retention times and peak area ratios. A peak capacity of more than 8000 was obtained when an extract of *Ginkgo biloba* was analyzed. The analysis of a waste water sample revealed the high separation power of the method and the applicability of the CCS database for non-target analysis. Therein, due to the better separation, after LC+LC-IM-qTOF-MS analysis a significantly higher number of analytes was identified than in the same sample after a 1D-LC-IM-qTOF-MS measurement.

Finally, a GC-APCI-IM-qTOF-MS coupling was realized. Exemplified through a *Ginkgo biloba* sample it was also demonstrated here, that IMS as an additional separation dimension can reveal additional information about a sample.

Abkürzungsverzeichnis

1D-LC	Eindimensionale Flüssigchromatographie
2D-LC	Zweidimensionale Flüssigchromatographie
ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization (chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)
CCS oder Ω	Collision Cross Section (Stoßquerschnitt)
CER	Ceramide
cm	Centimeter
CV	Kompensationsspannung (compensation voltage)
D	Diastereomere
Da	Dalton
DART	Direct analysis in real time
DC	Gleichspannung (direct current)
DESI	Desorptions Elektrospray-Ionisation
DG	Diglycerid
DMS	Differential mobility spectrometry
DTIMS	Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometrie
E	Elektrische Feldstärke
e	Elektrische Elementarladung
E	Enantiomere
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAIMS	Asymmetrische Feld Ionenmobilitätsspektrometrie
FWHM	Peakbreite auf halber Höhe
GC	Gaschromatographie
H	Bodenhöhe
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IM-MS	Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
K	Spezifische Mobilität
K	Konstitutionsisomere
k	Retentionsfaktor
K ₀	Reduzierte Mobilität

k_b	Boltzmann-Konstante
L	Länge
LC+LC	Kontinuierliche multi-heartcutting zweidimensionale Flüssigchromatographie
LC-LC	Heart-cutting 2D-LC
LCxLC	Komprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
LPC O/P	LPC mit Alkylethersubstituent
LPE	Lyso-Phosphatidylethanolamin
m/z	Masse-zu-Ladungs Verhältnis
m_A	Masse des Analyten
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation (Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
m_B	Masse des Driftgases
MeOH	Methanol
min	Minuten
MP	Mobile Phase
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunden
N	Bodenzahl
n	Peakkapazität
N_0	Dichte des Driftgases bei Standardtemperatur
O_A	Orthogonalitätsfaktor
p	Druck
PA	Diacylglycerophosphat
PC	Phosphatidylcholin
PC O/P	PC mit Alkylethersubstituent
PE	Phosphatidylethanolamin
PE O/P	PE mit Alkylethersubstituent
PG	Glycerophosphoglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin

qTOF	Quadrupol-Time-of-flight
R	Auflösung
RF	Wechselspannung (radio frequency)
RSD	Relative Standardabweichung
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SM	Sphingomyelin
SP	Stationäre Phase
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
T	Temperatur
t_0	Flugzeit der Ionen vom Ende der IM-Driftröhre zum Detektor
TAG	Triglyceride
t_d	Driftzeit
t_{Fix}	Mobilitätsunabhängiger Beitrag zur Flugzeit
t_G	Laufzeit des Gradienten
t_{ges} bzw. t_D	Gesamte Flugzeit der Ionen vom Eingang der IM-Driftröhre bis zum Detektor
t_M	Totzeit
TOF	Time-of-flight (Flugzeit-Massenspektrometrie)
t_R	Retentionszeit
TWIMS	Traveling wave Ionenmobilitätsspektrometrie
V	Spannung
v_D	Driftgeschwindigkeit
w_b	Peakbasisbreite
z	Ladungszustand
α	Trennfaktor
β	Proportionalitätskoeffizient für die CCS Messung
γ	Modifizierter Koeffizient für die reduzierte Masse
Δ	Differenz
σ	Standardabweichung
ϕ	Phase der Fraktionierung
μs	Mikrosekunden

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	2
2.1	Ionenmobilitätsspektrometrie.....	2
2.1.1	Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometrie (DTIMS).....	3
2.1.2	Traveling wave Ionenmobilitätsspektrometrie (TWIMS).....	6
2.1.3	Asymmetrische Feld Ionenmobilitätsspektrometrie (FAIMS) / Differential mobility spectrometry (DMS).....	8
2.1.4	Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie (IM-MS).....	10
2.1.5	Collision Cross Section (CCS)	12
2.2	Flüssigchromatographische Trenntechniken	14
2.2.1	Eindimensionale HPLC	14
2.2.2	Zweidimensionale HPLC.....	19
3	Problemstellung und Zielsetzung	27
4	Experimenteller Teil	29
4.1	Geräte und Materialien	29
4.1.1	Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie	29
4.1.2	Flüssigchromatographisches System	29
4.1.3	Gaschromatographie	29
4.1.4	Software.....	30
4.1.5	Sonstige Geräte	30
4.1.6	Verbrauchsmaterialien	31
4.2	Chemikalien.....	31
4.3	Methoden	32
4.3.1	Kalibration des IM-qTOF-MS	32
4.3.2	Bestimmung von CCS für die Datenbank	32

4.3.3	Messungen mittels 1D-LC-IM-qTOF-MS.....	33
4.3.4	Messungen mittels LC+LC-qTOF und LC+LC-IM-qTOF-MS	38
4.3.5	Messungen mittels GC-APCI-IM-qTOF-MS	40
4.4	Probenvorbereitung	41
4.4.1	Fruchtsaft.....	42
4.4.2	<i>Castanea sativa</i>	42
4.4.3	OP9 Zellextrakt	42
4.4.4	Olivenöl.....	42
4.4.5	Eigelb	42
4.4.6	<i>Ginkgo biloba</i>	43
4.4.7	Kaffee	43
4.4.8	Abwasser	43
5	Ergebnisse und Diskussion.....	45
5.1	Bestimmung von Collision Cross Sections und Aufbau einer Datenbank....	45
5.1.1	Bestimmung von CCS nach der Stepped-Field Methode und der Single-Field Methode	45
5.1.2	Trennung von Isobaren.....	57
5.1.3	Erstellung und Anwendung einer Datenbank.....	65
5.2	Analyse von Realproben mit HPLC-(IM)-qTOF-MS.....	67
5.2.1	Analyse von Fruchtsäften mit HPLC-IM-qTOF-MS	67
5.2.2	Analyse von <i>Castanea sativa</i> mit HPLC-IM-qTOF-MS	77
5.2.3	Analyse von lipidhaltigen Realproben mit HPLC-IM-qTOF-MS.....	79
5.3	Aufbau einer kontinuierlichen multi-heartcutting Methode (LC+LC) zur Kopplung an ein IM-qTOF-MS.....	81
5.3.1	Prinzip der LC+LC.....	82
5.3.2	Aufbau des Systems	83
5.3.3	Analyse von <i>Ginkgo biloba</i>	86

5.3.4	Non-target Analyse einer Abwasserprobe mit HPLC-IM-qTOF-MS und LC+LC-IM-qTOF-MS.....	92
5.4	Analyse von <i>Ginkgo biloba</i> mit GC-APCI-IM-qTOF-MS	99
5.5	Ausblick	102
6	Zusammenfassung.....	103
7	Anhang.....	105
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	121
7.2	Tabellenverzeichnis.....	125
8	Literatur.....	127

1 Einleitung

Eine der Herausforderungen der analytischen Chemie ist es, möglichst viele Substanzen einer komplexen Probe wie Lebensmittel-, Umwelt- oder Humanproben mit möglichst einer Methode zu erfassen, zu identifizieren und zu quantifizieren. Dabei ist der Einsatz chromatographischer Methoden heute üblich, wobei je nach Fragestellung die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) oder die Gaschromatographie (GC) eingesetzt werden. Zur Erhöhung der Trennleistung werden immer häufiger auch zweidimensionale Trennverfahren verwendet (z. B. GCxGC und LCxLC). Bei der Identifizierung unbekannter Komponenten einer Probe ist die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) ein wichtiges Werkzeug. Die Bestimmung exakter Massen ermöglicht es zumindest, eine oder mehrere mögliche Summenformeln einer Substanz festzustellen, wobei jede Summenformel wiederum mehrere Strukturen beinhalten kann. Zur Untersuchung der genaueren Struktur bieten sich MS/MS-Experimente an, in denen über das Fragmentmuster weitere Informationen über einen Analyten gewonnen werden können. Bei Analysen mittels GC-MS und Elektronenstoß-Ionisation (EI) ist ein direkter Vergleich mit umfangreichen Spektrendatenbanken gebräuchlich.

Die Einführung der Ionenmobilitätspektrometrie (IMS) als weitere Trenndimension neben Chromatographie und Massenspektrometrie ermöglicht es nicht nur, Substanzen zusätzlich zu ihrer Wechselwirkung mit einer stationären Phase und ihrer Masse nach ihrer Größe und Gestalt zu trennen, sondern gleichzeitig auch, ihren Stoßquerschnitt (*engl. collision cross section, CCS*) als zusätzlichen Parameter zur Charakterisierung und Identifizierung zu ermitteln. Seitdem kommerzielle IM-MS Systeme verfügbar sind, ist die Zahl der Publikationen in diesem Bereich stark angestiegen. Eine große Aufgabe ist es nun, Datenbanken mit CCS-Werten aufzubauen und kontinuierlich zu erweitern, die in Kombination mit der exakten Masse eine zuverlässige Identifizierung ermöglichen. Der Beginn des Aufbaus einer solchen Datenbank ist ein Teil dieser Arbeit. Des Weiteren ist es als Ziel zu nennen, die leistungstärksten der modernen Methoden miteinander zu verknüpfen, um bestmögliche Erkenntnisse über die Zusammensetzung einer Probe zu gewinnen. Diese Arbeit beschreibt daher die Entwicklung einer Kopplung aus zweidimensionaler Flüssigchromatographie und Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie, mit der komplexe Proben in vier Dimensionen getrennt und ihre Komponenten über Masse und Stoßquerschnitt identifiziert werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Ionenmobilitätsspektrometrie

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Ionisation von Luft durch radioaktive Strahlung [1,2] und die Mobilität von Ionen [3] untersucht. LANGEVIN beschrieb Wechselwirkungen zwischen Ionen und neutralen Molekülen [4] und veröffentlichte 1905 ein kinetisches Modell zur Bewegung von Ionen in elektrischen Feldern [5]. Diese Grundlagen und weitere Entwicklungen der nächsten zwei Jahrzehnte fasste TYNDALL 1938 in der Monographie „Mobility of positive Ions in gases“ [6] zusammen. Das erste Ionenmobilitätsspektrum wurde 1929 von VAN DE GRAAFF aufgenommen [7]. Erste chemische Analysen aufgrund von Ionenmobilität wurden Mitte der 1960er Jahre durchgeführt [8–10]. Häufige Anwendungen sind seitdem die Detektion von Spurenstoffen in der Atmosphäre [11–13] oder in Wasser [14], Explosivstoffen [15–17] und chemischen Kampfstoffen [18]. Erste Versuche zur Kopplung von Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) mit Massenspektrometrie (IM-MS) fanden in den 1960er Jahren statt [19–21].

Die Ionenmobilitätsspektrometrie kann als eine elektrophoretische Trennung in der Gasphase betrachtet werden. Dabei werden in einem schwachen elektrischen Feld unter Anwesenheit eines inerten Driftgases Ionen aufgrund ihrer Mobilität, die durch Größe und Gestalt sowie Ladung der Ionen beeinflusst wird, getrennt. Die Ionen bewegen sich aufgrund ihrer Ladung z unter dem Einfluss des elektrischen Feldes. Durch Stöße mit den neutralen Driftgasmolekülen werden die Ionen dabei ausgebremst. Ionen mit einem großen Stoßquerschnitt (*engl. collision cross section, CCS*) stoßen öfter als kleinere Ionen und driften dadurch langsamer durch das elektrische Feld. Die resultierende Driftgeschwindigkeit der Ionen v_D setzt sich zusammen aus der elektrischen Feldstärke E und der für jedes Ion spezifischen Mobilität K :

$$v_D = KE$$

Gleichung 1

Aus der bekannten Länge der Driftstrecke L und der Driftzeit t_d , die ein Ion benötigt, um diese Strecke zu passieren, kann die Driftgeschwindigkeit ermittelt werden.

$$v_D = \frac{L}{t_d}$$

Gleichung 2

Einsetzen von Gleichung 2 in Gleichung 1 und Auflösen nach K ergibt für die Mobilität eines Ions:

$$K = \frac{L}{t_d E}$$

Gleichung 3

Diese Mobilität hängt von der Art des Driftgases sowie der Moleküldichte des Driftgases ab, die sich mit dem Druck und der Temperatur ändert. Um unter verschiedenen Bedingungen auf verschiedenen Spektrometern ermittelte Ionenmobilitäten vergleichen zu können wird die reduzierte Mobilität K_0 durch Normalisierung auf Normaldruck ($p_0 = 760$ torr) und Normaltemperatur ($T_0 = 273,15$ K) berechnet. [22,23].

$$K_0 = \frac{L}{t_d E} \cdot \frac{273,2 \text{ K}}{T} \cdot \frac{p}{760 \text{ torr}}$$

Gleichung 4

Je nach instrumentellem Aufbau, Erzeugung des elektrischen Feldes und Druck können verschiedene Arten der IMS unterschieden werden. Die wichtigsten Techniken der Ionenmobilitätsspektrometrie werden im Folgenden beschrieben.

2.1.1 Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometrie (DTIMS)

Bei der Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometrie (*engl. drift-time ion mobility spectrometry*, auch *drift-tube ion mobility spectrometry*, DTIMS) wird in einer länglichen Driftröhre, die mit einem inerten Driftgas gefüllt ist, ein konstantes, schwaches elektrisches Feld angelegt. Nachdem dafür in ersten Experimenten noch parallele Plattenkondensatoren verwendet wurden [4,24,25], ist heute die in den 1930er Jahren [26,27] entwickelte Form aus aneinander liegenden Ringelektroden üblich [28], deren schematischen Aufbau Abbildung 1 zeigt. Die Röhre mit einer Länge zwischen 3,5 cm [29] und 290 cm [30] ist aus mehreren gestapelten Ringelektroden, meist aus Kupfer, die jeweils durch einen Isolator, z.B. einen Teflonring, getrennt sind, aufgebaut [31]. Durch einen linearen Spannungsgradienten von der ersten bis zur letzten Elektrode entsteht ein elektrisches Feld mit Stärken zwischen 2,5 und 100 V/cm [22,32].

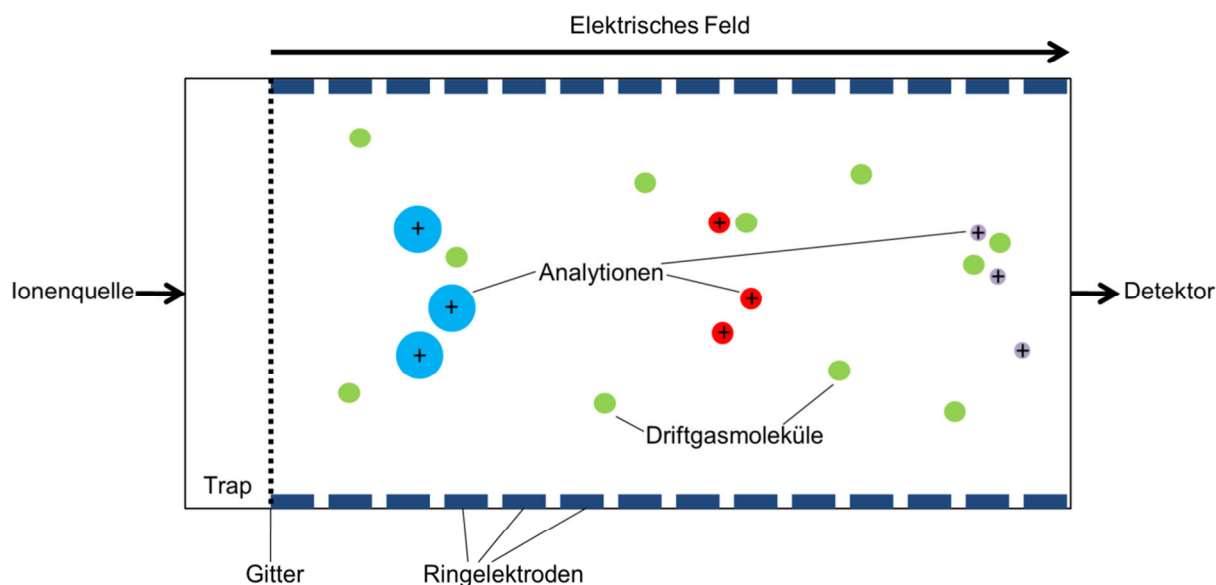


Abbildung 1: Prinzip der DTIMS. An den Ringelektroden liegt ein linearer Spannungsgradient an. Die Analytione werden in einer *Trap* gesammelt und durch das Gitter in Paketen in die Driftröhre entlassen. Die Trennung findet aufgrund von Ladung, Größe und Gestalt der Ionen durch Stöße mit den Driftgasmolekülen statt.

Die anwendbare Feldstärke E ist dabei limitiert durch den Druck, da nach MASON und MCDANIEL bei einem zu hohen Quotienten aus E und der Gasdichte N bzw. dem Druck p die Mobilität des Ions nicht mehr unabhängig von E ist. Die Bedingungen für ein schwaches elektrisches Feld sind demnach nur gegeben wenn $E/p \ll 2 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{torr}^{-1}$ beträgt [33]. Die am häufigsten verwendeten Driftgase sind Helium [34,35], Stickstoff [36,37], Argon [38] und CO_2 [39,40]. Dabei werden sowohl Atmosphärendruck [41,42] als auch reduzierte Drücke zwischen 1 und 15 mbar [31,43] eingesetzt. Von der Ionenquelle kommende Analytione werden zunächst in einer *Trap* gesammelt (s. Abbildung 1). Dies kann durch Anlegen einer Spannung an ein Bradbury-Nielsen-Gitter [44] geschehen. Durch Absenken des Potentials an dem Gitter können die Ionen dieses passieren und werden so als Ionenpaket zu einer definierten Startzeit in die Driftröhre entlassen, wo sie durch das elektrische Feld beschleunigt werden und sich gemäß ihrer Ladung in Richtung Detektor bewegen. Stöße mit den neutralen Driftgasmolekülen verlangsamen die Ionen dabei, sodass ihre tatsächliche Driftgeschwindigkeit sowohl vom Stoßquerschnitt als auch von der Ladung abhängt. Die Analytione werden somit nach ihrem Größe-zu-Ladungs Verhältnis getrennt. Mehrfach geladene Ionen werden dabei stärker beschleunigt als einfach geladene und erreichen den Detektor nach kürzeren Driftzeiten. Bei Ionen gleicher

Ladung, aber unterschiedlicher räumlicher Struktur und Größe, erreichen die kleineren den Detektor schneller, da sie weniger oft mit dem Driftgas stoßen. So wird auch eine Trennung isobarer Substanzen, die die gleiche Masse besitzen und daher in der Massenspektrometrie das gleiche Signal liefern, sich aber durch eine unterschiedliche Verknüpfung in ihrer Struktur unterscheiden, möglich [37,45]. Verschiedene Arbeitsgruppen wie die von CLEMMER [30,43,46], BOWERS [47,48], JARROLD [49,50] und HILL [51,52] forschen mit selbst gebauten Driftröhren. Das erste kommerzielle Drifttube-Instrument wurde 1970 von COHEN et al. gebaut [53]. 2014 brachte Agilent Technologies ein IM-qTOF-MS Gerät mit DTIMS Technik heraus [54], das in dieser Arbeit verwendet wurde (Agilent 6560 Ion Mobility Q-TOF) .

Um die Trennleistung der Ionenmobilitätsspektrometrie zu beschreiben und zu vergleichen, wird die Auflösung R angegeben. Diese ist definiert als das Verhältnis aus der Driftzeit t_d eines einzelnen Peaks im Driftspektrum zu seiner Peakbreite auf halber Höhe (*engl. full width at half maximum, FWHM*) [8,55]. Die maximal erreichbare Auflösung ist durch die Diffusion der Ionen limitiert und wird hier als R_D abgekürzt [56]:

$$R_D = \frac{t_d}{FWHM} = \sqrt{\frac{LEq}{16k_b T \ln 2}}$$

Gleichung 5

Dabei ist L die Länge der Driftstrecke, E die elektrische Feldstärke, q die Ladung des Ions, k_b die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Nach Gleichung 5 kann die Auflösung also vor allem durch eine längere Driftstrecke oder ein stärkeres elektrisches Feld sowie eine niedrigere Temperatur verbessert werden. Die Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometrie bietet von den bekannten IMS Techniken die beste Auflösung [57]. Mit der DTIMS wurden bei einer Driftstrecke von 79 cm Auflösungen bis 73 publiziert [58]. Mit einer zyklischen Driftröhre, bei deren Design die Driftstrecke beliebig lang sein kann, erreichten MERENBLOOM et al. Auflösungen von mehr als 300 [59]. Eine Erhöhung der Auflösung kann zudem durch erhöhten Druck in der Driftröhre erreicht werden, da unter diesen Bedingungen häufiger Stöße zwischen Ionen und neutralen Gasmolekülen stattfinden. Zudem erlaubt ein höherer Druck nach den

oben genannten Bedingungen für E/p auch das Anlegen einer höheren Driftspannung, die bei reduziertem Druck limitiert ist [31,60–62].

Die Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometrie ist vom Aufbau her die einfachste Form der IMS und zudem die einzige, die es erlaubt, den CCS-Wert eines Ions ohne weitere Kalibration direkt aus der Driftzeit zu berechnen. Hierauf wird im Detail in 2.1.5 eingegangen. Als Nachteil der DTIMS ist eine verringerte Sensitivität zu nennen, die dadurch zustande kommt, dass ein Ionenpaket erst in die Driftröhre injiziert werden kann, wenn das vorherige den Detektor erreicht hat und so Zeit zwischen den einzelnen Ionenpaketen ungenutzt bleibt [63]. Eine Verbesserung kann hier durch Multiplexing erreicht werden, wobei in unregelmäßigen Abständen sich überlagernde Ionenpakete injiziert und die Daten anschließend über eine Hadamard- oder Fouriertransformation aufbereitet werden [64–67].

2.1.2 Traveling wave Ionenmobilitätsspektrometrie (TWIMS)

In der Traveling wave Ionenmobilitätsspektrometrie (TWIMS) wird, ähnlich wie in der DTIMS, eine Driftröhre aus gestapelten Ringelektroden verwendet. Anstelle eines konstanten elektrischen Feldes wird bei TWIMS jedoch eine hochfrequente Wechselspannung (*engl. radio frequency*, RF) mit entgegengesetzten Phasen an benachbarten Ringen angelegt, die von einer Gleichspannung (*engl. direct current*, DC) überlagert wird (s. Abbildung 2). Diese Gleichspannung bewegt sich mit 300 bis 1300 m/s [8] über die aufeinanderfolgenden Elektroden hinweg. Dabei ergeben sich Spannungspulse, sodass ein elektrisches Feld wie eine Welle über die einzelnen Ringelektroden in Driftrichtung der Ionen wandert (*engl. traveling wave*). Ionen mit höherer Mobilität bewegen sich mit diesem Feld, sodass sie auf der Welle „surfen“, während solche mit geringerer Mobilität öfter dahinter zurückbleiben und somit mehr Zeit brauchen, um die gesamte Driftröhre zu passieren. Die Grundlagen für diese Technik sind in Untersuchungen zur Bewegung von geladenen Teilchen in oszillierenden Feldern von GERLICH zu finden [68]. Ansätze zur genauen Erklärung der Theorie von TWIMS bieten Arbeiten von SHVARTSBURG und SMITH, die sich mit der Simulation der Ionendynamik beschäftigt [69] und die Auswirkung verschiedener Parameter auf die TWIMS Trennung untersucht haben [70]. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus und der Funktionsweise von TWIMS liefern zudem GILES et al. [71].

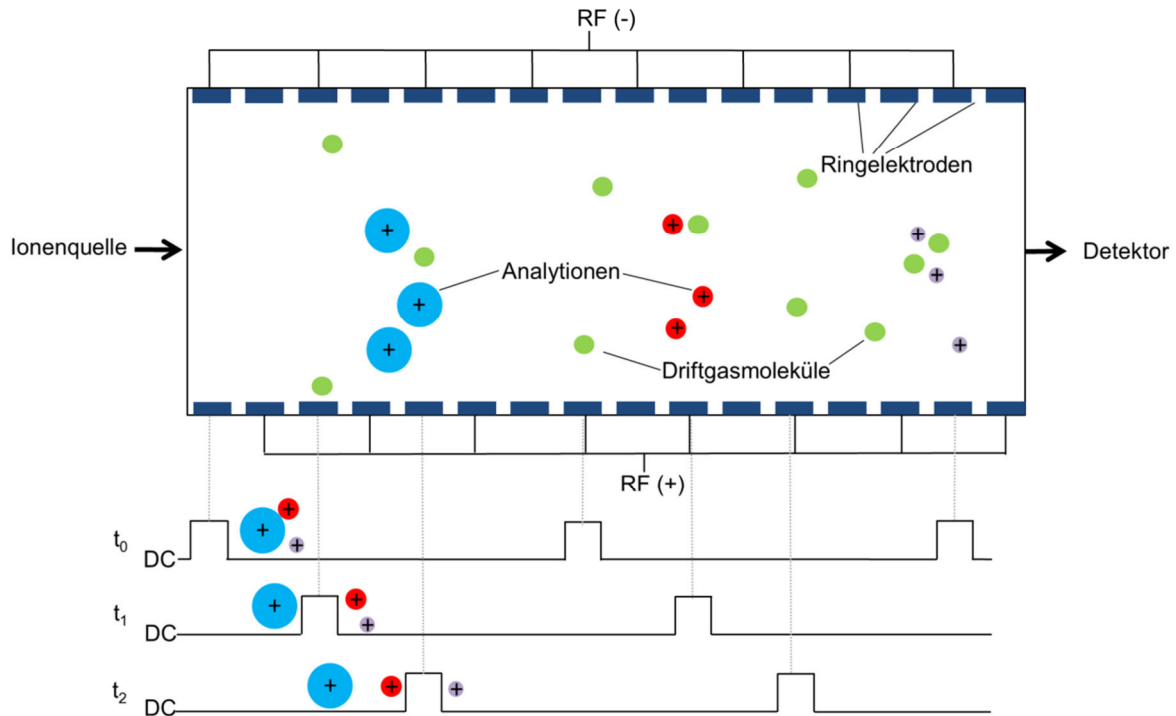


Abbildung 2: Prinzip der TWIMS. An benachbarten Ringelektroden liegt eine entgegengesetzte Wechselspannung (RF) an. Ein Gleichspannungspuls (DC) wandert mit der Zeit (Zeitpunkte t_0 , t_1 , t_2) über die einzelnen Ringelektroden. Ionen mit geringer Mobilität bleiben dabei hinter diesen Spannungspulsen zurück, während Ionen mit höherer Mobilität sich mit dieser „Welle“ bewegen.

2006 brachte Waters mit dem *Synapt HDMS* das erste kommerziell erhältliche Traveling wave IMS Instrument, gekoppelt mit Flugzeit (*engl. time-of-flight*, TOF) Massenspektrometrie, heraus [72]. Durch Weiterentwicklung der Technik konnte 2009 beim *Synapt G2* mit $R \sim 45$ eine viermal höhere Auflösung erzielt werden als beim ersten Modell [73,74]. Die Auflösung wird bei TWIMS üblicherweise über die Collision Cross Section eines Driftpeaks angegeben [73]:

$$R_D = \frac{\Omega}{\Delta\Omega}$$

Gleichung 6

Insgesamt werden geringere Auflösungen erreicht als mit DTIMS Instrumenten [32,57]. Eine für TWIMS sehr hohe Auflösung von 100 bei einer Messung von Peptiden wurde von GILLIG et al. publiziert [75]. Ein weiterer Nachteil der TWIMS Technologie ist, dass Collision Cross Section Werte nicht wie bei der DTIMS direkt berechnet werden können, sondern hierfür immer eine Kalibration mit Standards bekannter

CCS notwendig ist. Die Kalibration wird in vielen Arbeiten mit bereits bekannten Proteinen [76] oder Polyalanin durchgeführt [77–79]. Um das zu ermöglichen, wurden von mehreren Polyalaninmolekülen (Ala_n , $n = 3\text{--}33$) die CCS-Werte zunächst mit einer modifizierten Driftröhre in einem konstanten elektrischen Feld bestimmt [80]. Kritisch ist dabei, dass der Kalibrant den zu analysierenden Substanzen strukturell relativ ähnlich sein sollte [81]. Dies erschwert eine non-target Analyse. Als Vorteil der Traveling wave Technik ist eine höhere Sensitivität im Vergleich zur DTIMS zu nennen.

2.1.3 Asymmetrische Feld Ionenmobilitätsspektrometrie (FAIMS) / Differential mobility spectrometry (DMS)

Im Gegensatz zur bereits vorgestellten DTIMS wird bei der asymmetrischen Feld Ionenmobilitätsspektrometrie (*engl. field asymmetric ion mobility spectrometry*, FAIMS) oder auch DMS (*engl. differential mobility spectrometry*) ein starkes elektrisches Feld ($\sim 10000\text{ V/cm}$) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen gilt Gleichung 1 nicht mehr und die Ionenmobilität hängt direkt von der Feldstärke ab [82]. Der Aufbau besteht aus zwei planaren oder zylindrischen Elektroden, an die eine hochfrequente, unsymmetrische Spannung (*engl. dispersion voltage*, DV) angelegt wird, so dass sich abwechselnd zwei unterschiedlich starke elektrische Felder in entgegengesetzte Richtungen ergeben (s. Abbildung 3). Senkrecht dazu bewegt sich ein Ionenstrahl kontinuierlich mit einem Trägergasstrom. Durch die wechselnden Felder oszillieren die Ionen zwischen den beiden Elektroden, bewegen sich dabei aber aufgrund der Feldabhängigkeit ihrer Mobilität in Richtung des stärkeren Feldes mit höherer Mobilität als in die Gegenrichtung im schwächeren Feld. Dadurch gelangen sie verstärkt in die Richtung von einer der beiden Elektroden. Das Anlegen einer zusätzlichen Kompensationsspannung (CV) an einer der Elektroden bewirkt, dass Ionen einer bestimmten Ionenmobilität mittig zwischen den Elektroden fokussiert werden und das Feld in Richtung des Gasstroms verlassen können. So kann, vergleichbar mit dem Prinzip eines Quadrupols in der Massenspektrometrie, durch Einstellen einer festen Kompensationsspannung nur ein spezifisches Ion durchgelassen oder durch kontinuierliche Änderung der CV der gesamte Mobilitätsbereich der Ionen gescannt werden. Anstelle einer Driftzeit wird hier der für ein Ion spezifische Wert CV angegeben [57,83,84].

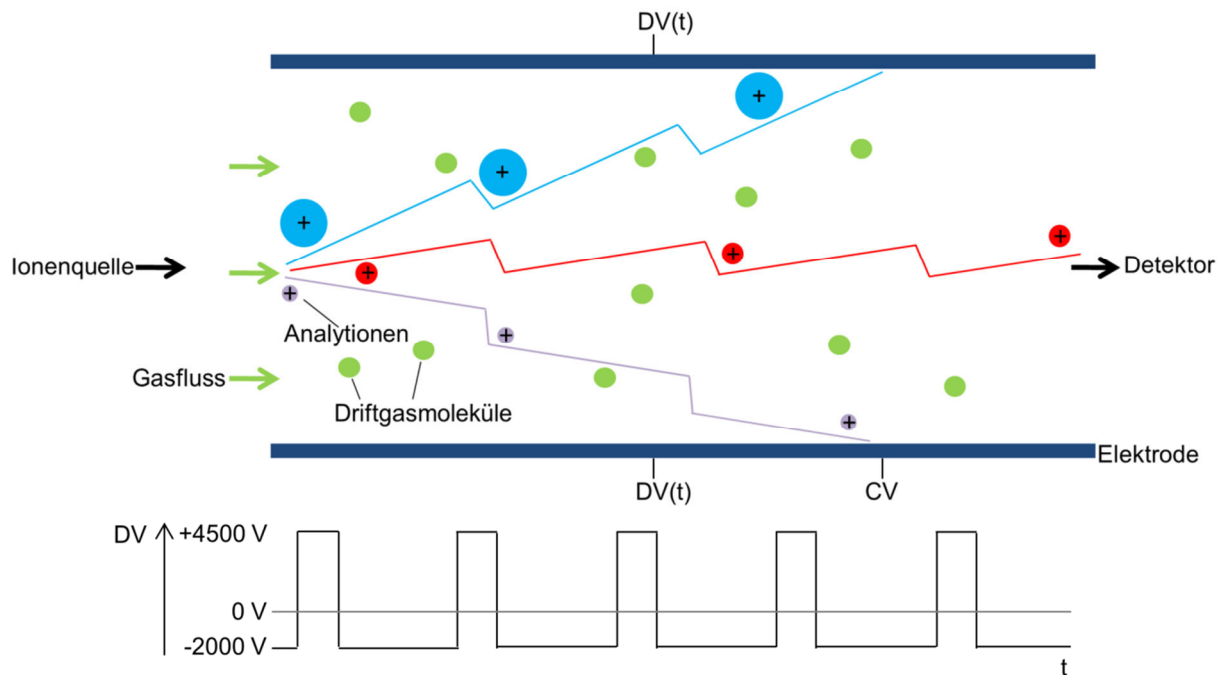


Abbildung 3: Prinzip der FAIMS. An den beiden Elektroden liegt eine hochfrequente, unsymmetrische Spannung (DV) an, so dass sich abwechselnd unterschiedlich starke elektrische Felder ausbilden. An der unteren Elektrode liegt zusätzlich eine Gleichspannung zur Kompensation (CV) an. Die Ionen werden nach ihrer feldabhängigen Mobilität getrennt und gelangen nur bei einer bestimmten Spannung CV zwischen den Elektroden hindurch zum Detektor.

Eine detaillierte Beschreibung der Grundlagen von FAIMS gibt SHVARTSBURG [85], der auch ein Modell zum Mechanismus der Trennung bei der FAIMS erstellt hat [86]. Dennoch sind die genauen Parameter, die die Mobilität eines Ions unter starken Feldbedingungen bestimmen und die vom m/z -Verhältnis und dem Stoßquerschnitt im schwachen Feld unabhängig zu sein scheinen, noch nicht völlig verstanden. PURVES et al. postulieren, dass hier eher die Fähigkeit eines Moleküls, seine Struktur zu ändern, eine Rolle spielt [87]. Der kontinuierliche Eintrag von Ionen in das FAIMS sorgt für eine deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zu DTIMS und TWIMS. Zudem kann durch Filtern eines bestimmten Ions im FAIMS vor dem Übergang in ein Massenspektrometer ein erhöhtes Signal-zu-Rausch Verhältnis erzielt werden [88]. Für die Analyse des gesamten Spektrums müssen jedoch alle Kompensationsspannungen durchgescannt werden, was die mögliche Datenaufnahmerate limitiert. Die Auflösung wird bei FAIMS analog zu Gleichung 5 bzw. Gleichung 6 als Quotient aus Kompensationsspannung und Peakbreite auf halber Höhe eines Signals angegeben:

$$R_D = \frac{CV}{\Delta CV}$$

Gleichung 7

In einigen wenigen Arbeiten wie z.B. von SHVARTSBURG et al. wurde bei der Trennung von Peptiden eine sehr hohe Auflösung von 50-100 [89,90] und durch weitere Optimierung des Systems sogar von 400-500 erreicht [91]. Generell werden mit FAIMS aber geringere Auflösungen um $R \sim 10$ erreicht [92]. Eine Reihe von Anwendungen, unter anderem zur Trennung von Isobaren und Analyse von Explosivstoffen, pharmazeutischen Stoffen und Umweltkontaminanten, sind in [93] zusammengefasst. Für die non-target Analyse ist FAIMS nicht geeignet, da wie oben beschrieben der gesamte CV Bereich gescannt werden muss, um alle Ionen zu erfassen und zudem keine CCS gemessen werden können, die zur Identifizierung von unbekannten Analyten beitragen könnten.

2.1.4 Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie (IM-MS)

Eine einfache Detektion nach der Trennung ist in der Ionenmobilitätsspektrometrie mit Detektoren wie zum Beispiel Faraday-Cups oder Faraday-Platten möglich, die das Auftreffen von gasförmigen Ionen in ein elektrisches Signal umwandeln, welches Informationen über Zeit und Intensität enthält [94,95]. Die Kombination von IMS und Massenspektrometrie bietet neue Möglichkeiten, die Eigenschaften eines Analytens zu untersuchen, da so in zwei Dimensionen nach Größe-zu-Ladungs Verhältnis (Ω/z) im IMS und nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) im MS getrennt werden kann. Die erste Kopplung von DTIMS mit einem Magnetsektorfeld-MS wurde 1961 von McDaniel realisiert [96]. Eine wichtige Entwicklung für den Einsatz der IM-MS bei flüssigen Proben stellt zudem die Electrospray Ionisation (ESI) dar [97,98]. Seitdem gab es eine ständige Weiterentwicklung der einzelnen Komponenten sowie eine Vielzahl an Kopplungen der verschiedenen Ionenquellen, IMS Techniken und Massenanalysatoren. Häufig eingesetzte Ionenquellen sind ESI [51,99–101] und MALDI, vor allem für IM-MS Analysen von Peptiden und Proteinen [102–104], aber auch DESI [105], DART [106] und Photoionisation [107] wurden beschrieben. Als Massenanalysatoren wurden TOF-MS [38,41,54,72], Quadrupol-MS [108–111], Ion Trap-MS [112,113], Fourier-Transformation-MS [52,114] und Magnet-Sektorfeld-MS [96] mit der IMS gekoppelt. Vor allem seit der Einführung eines kommerziellen TWIMS-MS

der Firma Waters ist die Zahl der Publikationen im Bereich IM-MS stark angestiegen. Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten DTIMS-qTOF-MS-Systems der Firma Agilent. Die Analyten gelangen nach der Ionisierung in einen *Front Funnel*, in dem sie fokussiert werden, und anschließend in einen *Trap Funnel*, an dessen Ende sich die *Trap*, bestehend aus Gittern am Eingang und am Ausgang, befindet. Von dort werden die Ionen in Paketen in die eigentliche Driftröhre mit 78 cm Länge entlassen, in der ein konstantes elektrisches Feld eingestellt ist (genaues Prinzip siehe 2.1.1). Nach der Trennung in der IMS findet im *Rear Funnel* eine erneute Fokussierung des Ionenstrahls statt, der von da aus in einen Quadrupol Massenfilter und weiter in eine Kollisionszelle gelangt, so dass auch gezielt MS/MS Experimente durchgeführt werden können. Hinter der Kollisionszelle werden die Ionen von einem *Pusher* in die feldfreie Driftstrecke des TOF-Flugrohrs beschleunigt und gelangen nach weiterer Umlenkung durch einen Reflektor zum Detektor. Werden die Gitterspannungen der *Trap* niedrig gehalten und so keine Ionen gesammelt, kann das Gerät im einfachen qTOF-Betrieb genutzt werden.

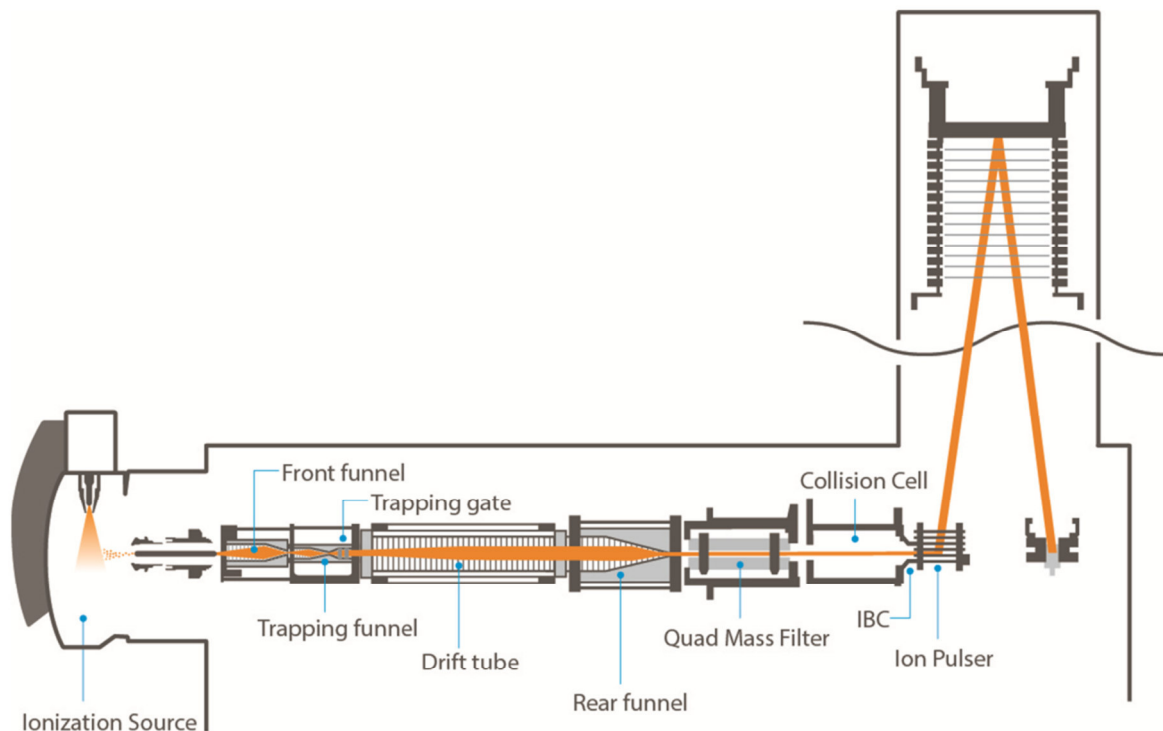


Abbildung 4: Aufbau eines IM-qTOF-MS Instruments (mit Genehmigung von Agilent Technologies [54])

Da größere Moleküle generell auch schwerer sind als kleinere, sind die beiden Trenntechniken IMS und MS nicht völlig orthogonal. Dennoch können bestimmte Substanzklassen – bedingt durch ihrer Anordnung der funktionellen Gruppen, intermolekulare Wechselwirkung oder Abstoßung, freie Elektronenpaare sowie andere Protonierungsstellen – eine größere räumliche Ausdehnung im Verhältnis zu ihrer Masse aufweisen als andere mit kompakterer Struktur. Bei einer Auftragung von Mobilitäten oder CCS-Werten gegen die Masse bzw. das m/z -Verhältnis der Analyten ergeben sich deshalb so genannte Trendlinien (*engl. trend lines*), wie von Karasek [115] und Karpas [116] Ende der 1970er Jahre anhand von primären, sekundären und tertiären Alkylaminen gezeigt. Von Bedeutung ist dies vor allem für Analysen von biologischen Matrices, da so ein schnelles Zuordnen von Substanzen zu bestimmten Klassen wie Peptide, Lipide oder Nucleotide möglich ist und eine Art Fingerabdruck erstellt werden kann [117,118].

Die Kopplung von IM-MS mit chromatographischen Methoden ermöglicht es, komplexe Proben in drei Dimensionen nach Retentionszeit, Ω/z - und m/z -Verhältnis zu trennen und so mehr Informationen in nur einem Lauf zu erhalten. Durch die Vortrennung werden zudem mögliche Ionensuppressionseffekte in der Quelle minimiert. Im Vergleich zur heute gebräuchlichen HPLC-MS Analyse bietet die HPLC-IM-MS Kopplung die Möglichkeit, coeluiierende isobare Substanzen zu trennen. Der Vorteil einer solchen Trennung in drei Dimensionen wurde bereits in vielen Anwendungen für komplexe Proben wie Plasma [119,120], Urin [121], Arzneistoffe [122] oder Speichel [123] gezeigt. Da sich die einzelnen Separationsschritte in ihrer Analysenzeit um Größenordnungen unterscheiden, können die Daten ineinander verschachtelt werden (*engl. nested*) [124,125]. So findet die Trennung in der HPLC innerhalb von Sekunden oder Minuten statt, während in der Ionenmobilitätsspektrometrie mehrere Trennzyklen in jeweils etwa 10 Millisekunden stattfinden, die wiederum eine Vielzahl an TOF-Transienten mit einer Dauer um 100 Mikrosekunden enthalten.

2.1.5 Collision Cross Section (CCS)

Wie bereits in 2.1 beschrieben hängt die Mobilität eines Ions in der IMS von dessen Stoßquerschnitt, nach der englischen Bezeichnung *Collision Cross Section* als CCS oder Ω abgekürzt, ab. Darunter wird die durchschnittliche Fläche bei dreidimensionaler Rotation des Ions, die mit den Driftgasmolekülen interagiert, verstanden. Die CCS

einer Substanz in verschiedenen Driftgasen sind daher nicht direkt vergleichbar und bei der Angabe von CCS-Werten sollte immer das entsprechende Driftgas genannt werden (z.B. Ω_{N_2} für CCS in Stickstoff). Bei der CCS handelt es sich um eine physikochemische Konstante, die für ein Molekülion spezifisch ist. Somit stellt sie einen weiteren Parameter dar, der zur Charakterisierung unbekannter Substanzen herangezogen werden kann. Als Ergänzung zu einer mittels hochauflösendem MS ermittelten exakten Masse kann die CCS einen Beitrag zur Identifizierung leisten bzw. die Sicherheit dabei erhöhen. Unter schwachen elektrischen Feldbedingungen, bei denen Gleichung 1 gilt, ist Ω umgekehrt proportional zur Mobilität des Ions. Dieser Zusammenhang wurde von MASON und MCDANIEL [33] über kinetische Theorien zur Ionenmobilität in Gasen hergeleitet und wird in der Mason-Schamp Gleichung ausgedrückt [126]:

$$\Omega = \frac{3ze}{16N_0} \cdot \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T \mu}} \cdot \frac{1}{K_0}$$

Gleichung 8

Dabei ist z der Ladungszustand des Ions, e die elektrische Elementarladung, N_0 die Dichte des Driftgases bei Standardbedingungen, k_b die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, μ die reduzierte Masse und K_0 die reduzierte Mobilität nach Gleichung 4. Die reduzierte Masse berechnet sich aus der Masse des Driftgasmoleküls m_B und der Masse des Analytens m_A zu:

$$\mu = \frac{m_B \cdot m_A}{m_B + m_A}$$

Gleichung 9

Einsetzen von Gleichung 4 und Gleichung 9 in Gleichung 8 ergibt:

$$\Omega = \frac{3ze}{16N_0} \cdot \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T}} \cdot \sqrt{\frac{1}{m_B} + \frac{1}{m_A}} \cdot \frac{t_d E}{L} \cdot \frac{760 \text{ torr}}{p} \cdot \frac{T}{273,2 \text{ K}}$$

Gleichung 10

Über diese Gleichung kann bei Messungen mit der in 2.1.1 beschriebenen DTIMS unter konstanten schwachen elektrischen Feldbedingungen E die CCS direkt aus der gemessenen Driftzeit t_d berechnet werden. Da bei der TWIMS das elektrische Feld E

nicht konstant ist und die Ionen durch dessen wellenförmige Bewegung nicht gleichmäßig driften, kann Gleichung 10 dabei nicht direkt angewendet werden. Es ist wie bereits in 2.1.2 erläutert eine Kalibration mit Standards bekannter CCS erforderlich, die den Analyten nach Möglichkeit relativ ähnlich sind. Mit FAIMS ist eine Bestimmung von CCS aufgrund der Abhängigkeit der Mobilität von der Feldstärke bisher nicht möglich.

In der Literatur sind bereits CCS Daten für einige Substanzklassen in verschiedenen Driftgasen, meist Helium oder Stickstoff, verfügbar. So gibt es vor allem Werte für Peptide [79,127–131] und Proteine [81,132], aber auch für Lipide [78,131], Metabolite [77], Kohlenhydrate [131,133] sowie für wenige pharmazeutische Substanzen [134] oder Pestizide [135].

2.2 Flüssigchromatographische Trenntechniken

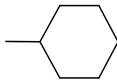
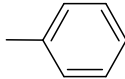
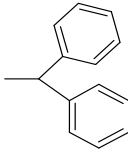
Chromatographische Trennmethoden umfassen im Allgemeinen Techniken, die Stoffe aufgrund unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften nach ihrer Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase trennen. Die erste flüssigchromatographische Trennung durch Adsorption in einer Säule wurde 1906 von TSWETT durchgeführt, der Chlorophyllfarbstoffe in Petrolether über eine mit Calciumcarbonat gefüllte Säule auftrennte [136]. Unter Flüssigchromatographie werden die Methoden zusammengefasst, die als mobile Phase (MP) eine Flüssigkeit verwenden. Die stationäre Phase (SP) kann dabei aus einer festen Phase (*engl. liquid-solid chromatography*, LSC) oder einer Flüssigkeit (*engl. liquid-liquid chromatography*, LLC) bestehen. Die Analyten bewegen sich durch den Fluss der mobilen Phase an der stationären Phase vorbei. Substanzen, die dabei stärker mit der SP wechselwirken, werden stärker retardiert und eluieren somit später von der Säule als solche mit geringer Wechselwirkung. Je nach Trennmechanismus kann dabei zwischen Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Größenausschluss- oder Affinitätschromatographie unterschieden werden [137].

2.2.1 Eindimensionale HPLC

Eine HPLC-Anlage besteht im Wesentlichen aus einer Pumpe für den Laufmitteltransport, einer Injektionseinheit mit Sechswegenventil, der Chromatographiesäule und einem Detektor. Findet die Trennung an einer polaren stationären Phase, z.B.

Kieselgel, mit einem unpolaren Lösungsmittel wie Hexan als mobile Phase statt, spricht man von Normalphasen-Chromatographie (NP). In der heute zumeist eingesetzten Umkehrphasen-Chromatographie (*engl. reversed-phase*, RP) wird dagegen eine unpolare stationäre Phase in Verbindung mit einer polaren mobilen Phase, meist wässrige Puffer mit Methanol oder Acetonitril, verwendet. Eine Vielzahl an kommerziell erhältlichen stationären Phasen mit chemisch modifizierten Oberflächen ermöglicht die Trennung verschiedenster Substanzgruppen aufgrund ihrer Polarität und funktionellen Gruppen. Eine Übersicht über häufig eingesetzte stationäre Phasen gibt Tabelle 1. Moderne HPLC- und UHPLC-Systeme arbeiten bei kleinen Partikeldurchmessern zwischen 1,3 und 5 μm mit Drücken bis zu 1500 bar [138]. Ab 2007 erfuhren zudem Säulen mit sogenannten Core-Shell Materialien eine starke Entwicklung, bei denen die Partikel einen festen Kern haben und Analyten nur in die äußere, poröse Schicht eindringen [139,140].

Tabelle 1: Häufig eingesetzte funktionelle Gruppen bei modifizierten stationären Phasen

Phase	Funktionelle Gruppe
Silicagel	—Si—OH
Trimethyl	—Si(CH ₃) ₃
Octadecyl (C18)	—(CH ₂) ₁₇ —CH ₃
Cyclohexyl	
Phenyl	
Diphenyl	
Amino	—NH ₂
Cyano	—C≡N

Die wichtigsten Kenngrößen der Chromatographie sollen im Folgenden kurz erläutert werden. Abbildung 5 a zeigt ein typisches Chromatogramm mit drei Peaks. Dabei ist t_M die Totzeit, die eine nicht retardierte Substanz benötigt, um die Säule zu passieren. Die anderen Substanzen verlassen die Säule nach der Retentionszeit t_R .

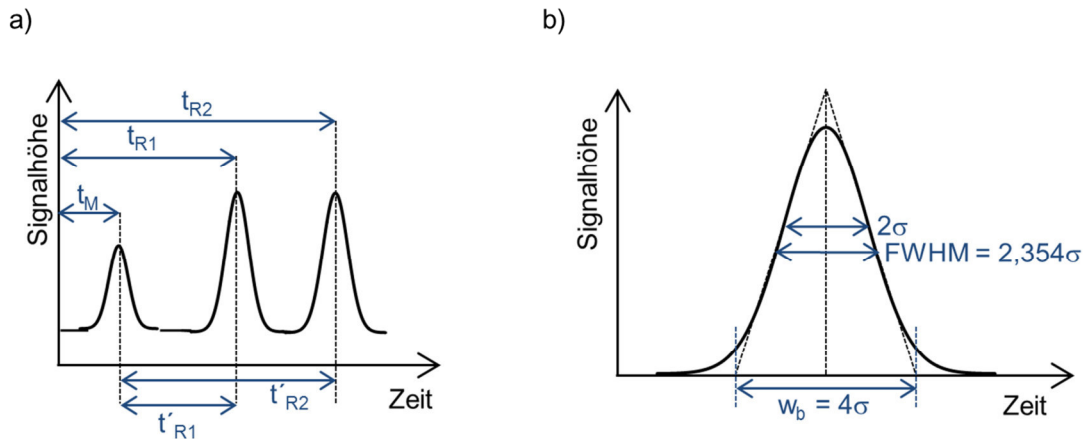


Abbildung 5: a) Chromatogramm mit Totzeit (t_M), Retentionszeiten von zwei Substanzen (t_R) sowie deren reduzierten Retentionszeiten (t'_R). b) Idealer gaußförmiger Peak mit Standardabweichung (σ), Peakbasisbreite (w_b) und Peakbreite auf halber Höhe (FWHM).

Die Differenz aus der Retentionszeit einer Substanz und der Totzeit wird als reduzierte Retentionszeit t'_R bezeichnet. Der Quotient aus t'_R und t_M ist der Retentionsfaktor k [141]:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Gleichung 11

Wie sehr sich zwei Substanzen in ihrer Retention auf einer bestimmten Phase unterscheiden gibt die Selektivität bzw. der Trennfaktor α an, der aus den Retentionszeiten zweier benachbarter Peaks berechnet wird:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

Gleichung 12

Um die Güte der Trennung zweier Substanzen zu beschreiben, ist α alleine nicht ausreichend, da hier die Peakbreite nicht mit berücksichtigt wird. Als Maß dafür wird die Auflösung R_S angegeben, in die die Retentionszeiten und die Peakbasisbreiten

(w_b) bzw. Peakbreiten auf halber Höhe ($FWHM$) wie in Abbildung 5 b gezeigt eingehen:

$$R_S = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b2} + w_{b1}} = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{FWHM_2 + FWHM_1}$$

Gleichung 13

Bei einer Auflösung von $R_S = 1,0$ sind zwei Peaks gut als getrennt zu erkennen, jedoch mit einer Überlappung von 2 % noch nicht quantitativ auswertbar. Eine Basislinientrennung zweier Peaks ist bei einer Auflösung von 1,5 erreicht [138].

In der Bodentheorie wird eine chromatographische Säule in mehrere theoretische Böden eingeteilt, auf denen sich jeweils ein Gleichgewicht der Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase einstellt [142]. Über die Anzahl dieser Böden N bzw. die Bodenhöhe H , die über die Länge L der Säule zusammenhängen, wird die Effizienz einer Chromatographiesäule beschrieben [141,143]:

$$H = \frac{L}{N}$$

Gleichung 14

N kann aus der Retentionszeit eines Peaks und dessen Breite (σ , w_b bzw. $FWHM$) wie in Abbildung 5 b dargestellt berechnet werden [141]:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{FWHM}\right)^2$$

Gleichung 15

Durch Kombination von Gleichung 13 und Gleichung 15 lässt sich unter der Annahme, dass benachbarte Peaks annähernd die gleiche Breite aufweisen, eine Abhängigkeit der Auflösung von der Bodenzahl sowie dem Retentions- und dem Trennfaktor herleiten [144]:

$$R_S = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k}{1 + k}\right) \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Gleichung 16

Während des chromatographischen Prozesses tragen verschiedene Faktoren zur Peakverbreiterung bei. Diese gehen in die van-Deemter-Gleichung ein, die einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Bodenhöhe H und der Geschwindigkeit der mobilen Phase u beschreibt [145]:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Gleichung 17

Dabei ist A der Beitrag der Eddy-Diffusion, die durch unterschiedlich lange Wege der Moleküle in der mobilen Phase durch die Packung der stationären Phase entsteht. B steht für den Beitrag der Längsdiffusion, die aufgrund des Konzentrationsgradienten längs zur Fließrichtung in der Säule stattfindet. Der Massenaustauschterm C beschreibt die Bandenverbreiterung durch die Diffusion der Analyten von und zur stationären Phase [146]. Abbildung 6 zeigt den Beitrag dieser drei Terme zur van-Deemter Kurve. Im Minimum der Kurve kann die optimale Fließgeschwindigkeit mit der kleinsten Trennstufenhöhe abgelesen werden. Der Verlauf der van-Deemter Kurve lässt sich unter anderem durch die Größe und Beschaffenheit der Partikel der SP beeinflussen. Die Verwendung der oben genannten Core-Shell Materialien führt beispielsweise zu einem geringeren Massenaustauschterm bei gleicher Partikelgröße, da die Analyten durch den festen Kern weniger tief in die Partikel eindringen. Zudem können die Säulen durch eine geringere Partikelgrößenverteilung gleichmäßiger gepackt werden, sodass auch die Eddy-Diffusion abnimmt [147–149].

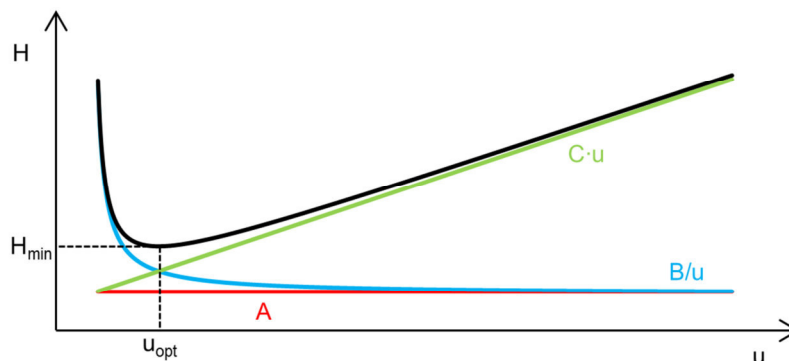


Abbildung 6: Van-Deemter Kurve der Bodenhöhe H in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit u (schwarz), zusammengesetzt aus den Termen der Eddy-Diffusion (A , rot), der Längsdiffusion (B/u , blau) und des Massenaustauschterms ($C \cdot u$, grün). Die geringste Bodenhöhe H_{\min} wird bei der optimalen Fließgeschwindigkeit u_{opt} erreicht.

Die maximale Anzahl an Peaks, die in einem Chromatogramm in einer definierten Zeit getrennt werden kann, wird als Peakkapazität bezeichnet [150]. Ein Zusammenhang zwischen der Peakkapazität und der theoretischen Bodenzahl N wurde bereits von GIDDINGS festgestellt [151]. Für isokratische Trennungen kann die Peakkapazität n_{iso} für eine gewünschte Auflösung R_S berechnet werden durch [152]:

$$n_{iso} = \frac{\sqrt{N}}{4R_S} \ln \left(\frac{1 + k_w}{1 + k_\alpha} \right)$$

Gleichung 18

Dabei ist k_w der Retentionsfaktor der am stärksten und k_α der am wenigsten retardierten Substanz. Bei Gradientenelution gilt dagegen für die Peakkapazität n_{grad} unter der Annahme, dass die Peakbreiten über das ganze Chromatogramm annähernd gleich sind [152]:

$$n_{grad} = \frac{t_G \sqrt{N}}{t_M 4R_S (1 + k_C)} = \frac{t_G}{4R_S \sigma}$$

Gleichung 19

Dabei ist t_G die Laufzeit des Gradienten und k_C der Retentionsfaktor zum Zeitpunkt der Elution. Nach DOLAN et al. kann die Peakkapazität n_{grad} bei Gradientenelution für eine gewünschte Auflösung $R_S = 1,0$ anhand der Peakbasisbreite w_b näherungsweise über

$$n_{grad} = \frac{t_G}{w_b}$$

Gleichung 20

berechnet werden [153]. Den Einfluss verschiedener Parameter wie Temperatur, Druck und Säulenlänge auf die erreichbare Peakkapazität untersuchten GRITTI et al. [154].

2.2.2 Zweidimensionale HPLC

Das Potential der Chromatographie in zwei Dimensionen, in denen nach unterschiedlichen Eigenschaften der Analyten getrennt wird, erkannten bereits CONSDEN et al., die 1944 eine zweidimensionale Papierchromatographie von einer Mischung mehrerer Aminosäuren durchführten [155]. Die Entwicklung zweidimensionaler chromatographischer Methoden wurde in den 1960er Jahren durch die Entwicklung von HPLC-Systemen mit zwei Dimensionen (2D-HPLC) vorangetrieben. Diese Systeme ermöglichen die Trennung von Substanzen, die in einer Dimension nicht vollständig getrennt werden können, durch eine zweite Dimension. Die Entwicklung zweidimensionaler chromatographischer Methoden wurde in den 1960er Jahren durch die Entwicklung von HPLC-Systemen mit zwei Dimensionen (2D-HPLC) vorangetrieben. Diese Systeme ermöglichen die Trennung von Substanzen, die in einer Dimension nicht vollständig getrennt werden können, durch eine zweite Dimension.

graphischer Methoden liefert eine deutliche Erhöhung der Peakkapazität gegenüber eindimensionalen Trennungen und wird häufig für die Trennung komplexer Proben sowohl als 2D-GC [156–159] als auch in Form von 2D-LC eingesetzt [160–162].

2.2.2.1 Online-SPE

Die Festphasenextraktion (*engl. solid phase extraction, SPE*) mit Kartuschen, die mit einem festen Phasenmaterial zur Adsorption der Analyten aus einer flüssigen Probe gefüllt sind, gehört zu häufig eingesetzten Techniken der Probenvorbereitung. Wird eine solche Kartusche als Vorsäule direkt vor eine HPLC-Säule geschaltet, spricht man von online-SPE [163–165]. Dabei werden bestimmte Komponenten der Probe entsprechend ihrer Wechselwirkung mit dem SPE-Material darauf retardiert und angereichert, während andere Matrixbestandteile nicht daran haften und ausgespült werden. Durch entsprechende Änderung der Laufmittelzusammensetzung werden die retardierten Analyten von der SPE-Säule eluiert und gelangen auf die eigentliche Trennsäule. Dadurch wird bei komplexen Proben eine Vortrennung erreicht, indem beispielsweise unpolare, organische Moleküle von einer polaren, salzhaltigen Matrix abgetrennt werden. Somit stellt die Online-SPE die einfachste Form der zweidimensionalen Chromatographie dar. Zudem können Komponenten im Spurenbereich vor der Analyse aus größeren Volumina angereichert und so die Sensitivität erhöht werden. [141,166]

2.2.2.2 Heart-cutting 2D-LC (LC-LC)

In der Heart-cutting 2D-LC (LC-LC) werden zwei Chromatographiesäulen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften verwendet. Eine einzelne oder einige wenige (bis zu 10 [167]) ausgewählte Fraktionen werden nach der Elution von der ersten Säule gesammelt und in die zweite Säule injiziert. Dies kann offline oder durch die Schaltung eines Ventils online erfolgen [168,169]. Dabei wird ein Peak von der ersten Dimension, in dem sich möglicherweise mehrere coeluierende Substanzen überlagern, als Ganzes auf die zweite Dimension übertragen und kann dort aufgrund einer anderen Selektivität der Phase weiter getrennt werden [170]. Abbildung 7 zeigt die resultierenden Chromatogramme aus beiden Dimensionen einer solchen Trennung. Die Heart-cutting Technik ist geeignet, um gezielt Komponenten einer Probe genauer zu analysieren und wird daher unter anderem für den Nachweis von Verunreinigungen in Pharmazeutika eingesetzt [171,172].

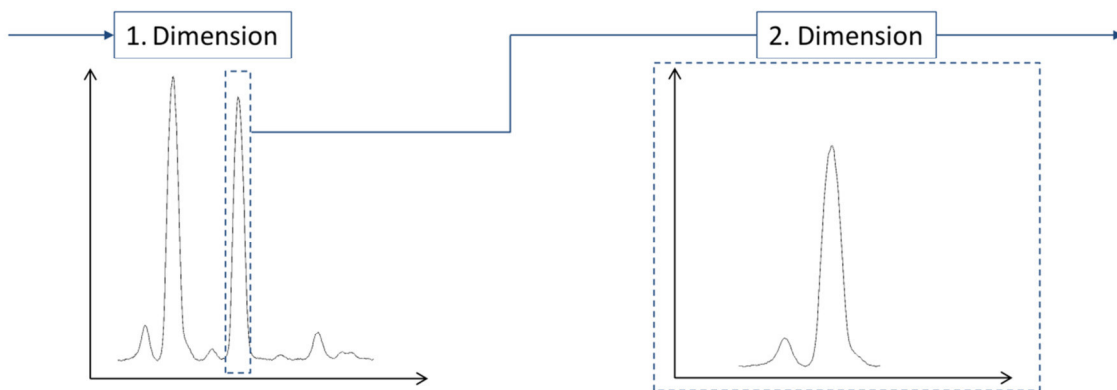


Abbildung 7: Trennung mit der Heart-cutting LC in der ersten Dimension (links) und weitere Trennung der ausgeschnittenen Fraktion auf der zweiten Dimension (rechts)

2.2.2.3 Komprehensive zweidimensionale HPLC

Bei der komprehensiven zweidimensionalen HPLC (LCxLC) wird im Gegensatz zur LC-LC die gesamte Probe in beiden Dimensionen getrennt, indem das Eluat von der ersten Dimension in Fraktionen gesammelt und jede dieser Fraktionen in die zweite Dimension injiziert wird [173]. Dabei wird als Interface ein Schaltventil mit zwei Probenschleifen eingesetzt. Am häufigsten sind bisher Lösungen mit 10-Port Ventilen [174]. Abbildung 8 zeigt schematisch das Prinzip eines in dieser Arbeit verwendeten Ventils (2-Pos/4-Port-Ventil).

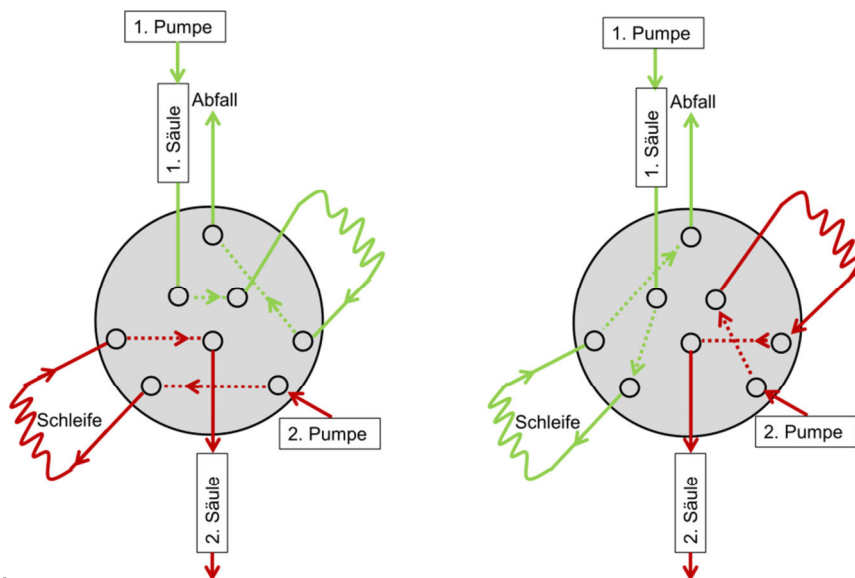


Abbildung 8: 2-Pos/4-Port-Ventil für die LCxLC; links: Das Eluat der 1. Dimension wird in der 1. Schleife gesammelt; rechts: Die in der 1. Schleife gesammelte Fraktion wird auf die 2. Säule injiziert und dort getrennt, während die nächste Fraktion von der 1. Dimension in der 2. Schleife gesammelt wird.

Das Sammeln von Fraktionen über eine festgelegte Zeit (Modulation) führt dazu, dass Anteile einer Komponente in mehreren Chromatogrammen der zweiten Dimension erscheinen. Für die zweidimensionale Darstellung in einem *Contour-Plot* werden die einzelnen Chromatogramme der zweiten Dimension nebeneinandergelegt und jede Komponente als ein Spot abgebildet (Abbildung 9). Neben dieser komplexeren Art der Darstellung gegenüber einem herkömmlichen 1D-Chromatogramm hat das Schneiden der Peaks den Nachteil, dass bei einer quantitativen Auswertung jeder Peak einzeln integriert werden muss und sich die Fehler dabei summieren [175,176]. Dennoch ist die Fraktionierung in der LCxLC durchaus erwünscht und erforderlich, wie im Folgenden erläutert werden soll.

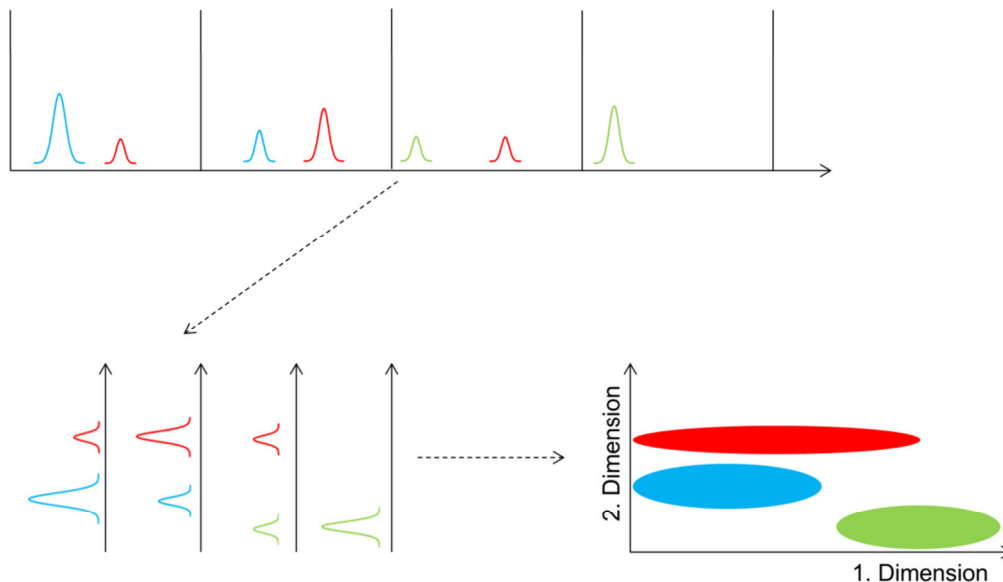


Abbildung 9: Darstellung der LCxLC Trennung in einem Contourplot

Die Grundlage für die LCxLC bilden Arbeiten von ERNI und FREI, die 1978 eine online-Kopplung von einer Gelpermeationchromatographie und einer Umkehrphasenchromatographie realisierten. Dabei wurden innerhalb von 10 Stunden 7 von der ersten Dimension kommende 1,5 mL-Fractionen gesammelt und nacheinander in der 2. Dimension analysiert [177].

1990 veröffentlichten BUSHEY und JORGENSEN die erste comprehensive zweidimensionale LC Trennung [178], bei der folgende drei Kriterien erfüllt sein müssen [179]:

1. Jeder Teil der Probe wird zwei unabhängigen (orthogonalen) Trennmechanismen unterzogen.
2. Gleiche Teile von allen Komponenten der Probe müssen beide Trennsäulen passieren und den Detektor erreichen.
3. Die Trennung der ersten Dimension bleibt weitestgehend erhalten.

Um das erste Kriterium der Orthogonalität zu erfüllen werden zwei Säulen mit unterschiedlichem stationärem Phasenmaterial verwendet oder die mobile Phase so variiert, dass sich die Trennmechanismen in beiden Dimensionen deutlich unterscheiden [180]. Bezüglich der zweiten Bedingungen ist es möglich, das Eluat der ersten Dimension zu splitten, sofern von allen Fraktionen gleiche Anteile in der zweiten Dimension analysiert werden. Zur Erfüllung des dritten Kriteriums sollte der Verlust der Auflösung in der ersten Dimension, der durch Totvolumina im Ventil und Peakverbreiterung in der zweiten Dimension nicht vollständig vermeidbar ist, nicht mehr als 10 % betragen [181]. Entscheidend dafür ist die Anzahl der Fraktionen, die über die gesamte Breite (8σ) eines Peaks der ersten Dimension gesammelt werden. Nach MURPHY et al. sollte diese mindestens drei bis vier betragen, was einer Sammelzeit von höchstens 2σ entspricht [182]. Bei einer zu langen Sammelzeit (Modulationszeit) werden in der ersten Dimension bereits getrennte Peaks wieder zusammengeführt (*engl. undersampling*) und die zweidimensionale Auflösung wird schlechter (vgl. Abbildung 10). Weiterführend zeigte SEELEY durch Computersimulationen, dass neben der Sammelzeit der Fraktionen auch die Phase ϕ der Fraktionierung und deren Einfluss auf die Vollständigkeit der Fraktionierung berücksichtigt werden muss [183]. Die Phase bezeichnet dabei die Position des Peakmaximums relativ zum Zeitpunkt der Modulation. Werden die Fraktionen von der ersten Dimension nicht vollständig auf die zweite Dimension übertragen, weil das Eluatvolumen größer ist als das Volumen der Probenschleife, findet in jeder Modulation ein Analytverlust statt. Je nach Phase kann ein Peak bei einer Sammelzeit von 8σ (Peakbreite) vollständig in einer Fraktion enthalten oder ungleichmäßig auf zwei Fraktionen aufgeteilt sein. Der Analytverlust wäre dann für die einzelnen Fraktionen unterschiedlich. Erst bei einer Modulationszeit von höchstens 2σ , also mindestens vier Modulationen pro Peak, ist eine gleichmäßige Übertragung gegeben und die Phase hat keinen Einfluss mehr [183–185]. Eine weitere Verringerung der Modulationszeit hätte jedoch zur Folge, dass weniger

Zeit für die Trennung in der zweiten Dimension zur Verfügung steht und so weniger Trennleistung möglich ist. Die Ermittlung der optimalen Modulationszeit ist daher für die Entwicklung einer LCxLC-Methode von großer Bedeutung [186].

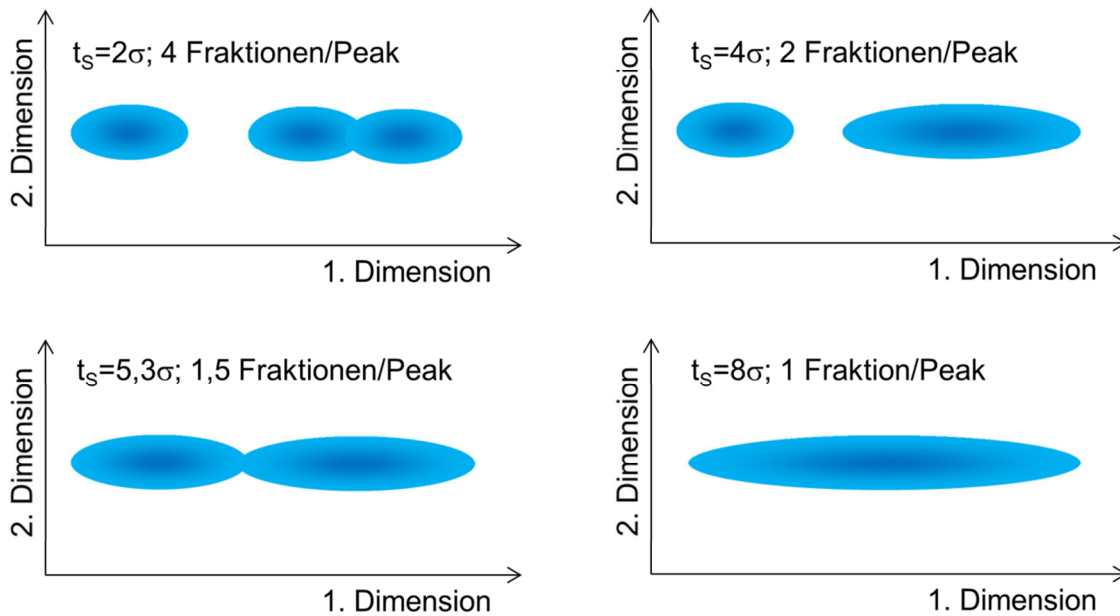


Abbildung 10: Effekt des Undersamplings auf die 2D-LC Auflösung: Werden je Peak aus der ersten Dimension 4 Fraktionen gesammelt (Sammelzeit $t_s = 2\sigma$), so bleibt die Auflösung der ersten Dimension erhalten und es sind drei Spots zu erkennen (oben links). Mit längerer Sammelzeit und dadurch weniger Fraktionen je Peak geht Auflösung verloren. Bei nur einer Fraktion je Peak (Sammelzeit $t_s = 8\sigma$, entspricht der Peakbreite) werden die drei Komponenten nur noch durch einen Spot abgebildet. Modifiziert nach [184].

Ein großer Vorteil der mehrdimensionalen Chromatographie ist die deutliche Erhöhung der Peakkapazität [187]. Diese kann nach GIDDINGS in erster Näherung als das Produkt aus den Peakkapazitäten der einzelnen Dimensionen berechnet werden [188]. Für die Peakkapazität ^{2DLC}n einer zweidimensionalen Trennung gilt also:

$$^{2DLC}n = {}^1n \cdot {}^2n$$

Gleichung 21

Dabei sind 1n und 2n die Peakkapazitäten in der ersten und der zweiten Dimension. Die tatsächlich erreichbare Anzahl an Peaks wird aber immer geringer sein als die nach Gleichung 21 berechnete. Zum einen wird die Trennfläche nie ganz ausgenutzt, wenn die beiden Trenndimensionen nicht völlig unabhängig voneinander sind [189]. Da dies in einem realen System kaum erreicht werden kann, muss eine Korrektur für die Orthogonalität eingeführt werden. Zum anderen geht durch das oben beschrie-

bede Problem des *Undersamplings* immer ein Teil der Auflösung in der ersten Dimension verloren. Einen Ansatz zur Berücksichtigung der Orthogonalität lieferten LIU et al. über die Berechnung der effektiv genutzten Fläche A_{eff} einer zweidimensionalen Trennung durch geometrische Überlegungen [190]. GILAR et al. ermittelten einen Orthogonalitätsfaktor, indem sie die 2D Trennfläche in kleine Quadrate (*engl. bins*) entsprechend der Anzahl an Datenpunkten unterteilten und den Anteil der tatsächlich mit Punkten belegten „bins“ an der gesamten Fläche bestimmten [191]. Allgemein kann also ein Orthogonalitätsfaktor O nach folgender Formel bestimmt werden, wobei A_{eff} die tatsächlich genutzte und A die gesamte Fläche des zweidimensionalen Chromatogramms ist [192]:

$$O = \frac{A_{eff}}{A}$$

Gleichung 22

Die Berechnung von A_{eff} ist bei Parallelogrammen oder komplexeren geometrischen Flächen – wie von DÜCK et al. gezeigt wurde – auch über vektorielle Berechnungen möglich [193].

HORIE et al. untersuchten die Limitierung der Peakkapazität durch die Modulationszeit und die damit verbundene Peakverbreiterung in der ersten Dimension [194]. Basierend auf [183] und [194] führten DAVIS et al. einen Faktor $\langle \beta \rangle$ zur Beschreibung dieser Peakverbreiterung ein [195]:

$$\langle \beta \rangle = \frac{\langle {}^1\sigma \rangle}{{}^1\sigma} = \sqrt{1 + 0,21 \left(\frac{t_S}{{}^1\sigma} \right)^2}$$

Gleichung 23

${}^1\sigma$ ist die Standardabweichung eines Peaks in der ersten Dimension vor der Fraktionierung, $\langle {}^1\sigma \rangle$ die entsprechende Standardabweichung nach Peakverbreiterung durch die Fraktionierung und t_S ist die Sammelzeit. Für die Berechnung der effektiven Peakkapazität einer 2D-LC Trennung schlagen STOLL et al. folgende Gleichung vor, in der sowohl die Peakverbreiterung durch *Undersampling* als auch die Orthogonalität berücksichtigt wird [196]:

$$n_{eff} = \frac{{}^1n \cdot {}^2n \cdot O}{< \beta >}$$

Gleichung 24

Die Kopplung von LCxLC mit Massenspektrometrie ermöglicht eine sehr hohe Trennleistung in drei Dimensionen und ist damit für die Analyse komplexer Proben von großer Bedeutung [197–199].

3 Problemstellung und Zielsetzung

Die Entwicklung der modernen Analytik geht dahin, immer mehr Inhaltsstoffe einer komplexen Probe in möglichst einem Analysenlauf zu trennen, zu erfassen und zu identifizieren. Bisher sind ein- und zweidimensionale gas- oder flüssigchromatographische Trennverfahren, gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie, dazu ein wichtiges Werkzeug. Die Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie bietet die Möglichkeit, einen weiteren Trennmechanismus einzuführen und CCS als zusätzlichen physikochemikalischen Parameter zu bestimmen. Durch die Realisierung von Kopplungen wie LC-IM-MS können die Vorteile aller drei Trenndimensionen ausgenutzt werden.

In dieser Arbeit sollen Eigenschaften und Anwendungsbereiche eines seit kurzem erhältlichen IM-qTOF-MS Systems untersucht und Methoden für die Analyse komplexer Proben entwickelt werden. Dazu soll zunächst die Funktion der Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie näher betrachtet werden. Dabei soll die Reproduzierbarkeit der Messungen untersucht und festgestellt werden, ob die Berechnung der CCS-Werte aus den gemessenen Driftzeiten nach zwei unterschiedlichen Verfahren (Stepped-Field und Single-Field Methode) vergleichbare Ergebnisse liefern. Weiterhin sollen das Potential der IMS zur Trennung isobarer Substanzen und die Grenzen dabei untersucht werden. Anschließend sollen CCS-Werte in Stickstoff als Driftgas für möglichst viele Einzelsubstanzen verschiedener Stoffklassen aufgenommen und in einer CCS Datenbank gesammelt werden. Dabei sollen sowohl Einzelstandards als auch eine Mischung mit charakterisierten Lipiden eingesetzt werden. Die so entwickelte Datenbank soll dann als Grundlage für die Analyse komplexer Realproben dienen. Zunächst soll durch die Kopplung eindimensionaler HPLC-Methoden mit IM-qTOF-MS das Potential einer solchen dreidimensionalen Trennung hinsichtlich der Unterscheidung von Isobaren, der softwaregesteuerten Featureanalyse und der Anwendbarkeit der zuvor entwickelten CCS Datenbank für die Identifizierung von Inhaltsstoffen gezeigt werden. Anschließend soll zur weiteren Verbesserung der Trennleistung eine zweidimensionale HPLC-Methode entwickelt werden, die für die Kopplung an das IM-qTOF-MS-System geeignet ist und so eine Analyse in vier Dimensionen erlaubt (LC+LC-IM-qTOF-MS). Nach der Charakterisierung dieser Methode hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Peakkapazität sollen Realproben damit analysiert und über die CCS Datenbank Komponenten darin identifiziert werden. Da-

bei soll auch der Vorteil dieser vierdimensionalen Trennung gegenüber einer dreidimensionalen HPLC-IM-qTOF-MS-Methode erörtert werden. Abschließend sollen erste Versuche unternommen werden, die Gaschromatographie mit einer modifizierten GC-APCI-Ionenquelle an das IM-qTOF-MS zu koppeln und so eine weitere Möglichkeit der Trennung komplexer Proben realisiert werden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte und Materialien

4.1.1 Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie

Agilent 6560 Ion Mobility Q-TOF Mass Spectrometer System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA), ausgestattet mit

- Ionenquelle für HPLC-ESI: Dual Jet Stream electrospray ionization (AJS ESI), Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA) bzw.
- Ionenquelle für GC-APCI: G3212 GC-APCI Source, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)

4.1.2 Flüssigchromatographisches System

Agilent 1290 Infinity 2D-LC, Agilent Technologies Inc., Waldbronn (Deutschland), bestehend aus folgenden Komponenten:

- Pumpe für erste und zweite Dimension sowie dritte Pumpe für *dilute-and-split*: 1290 Infinity binäre Pumpe (G4220A) mit Jet Weaver V35 Mixer
- 1290 Infinity Flexible cube Solvent Management Modul (G4227A)
- Autosampler: 1290 Infinity HiP sampler (G4226A)
- Säulenofen: 1290 Infinity Thermostatted Column compartment (G1316C)
- 8-Port Ventil: 2D-LC-Quick Change Valve (2 Pos/4 Port duo valve, G4236A)
- UV-Detektor: 1290 Infinity diode-array detector (G4212A)

4.1.3 Gaschromatographie

6890 N Gas Chromatograph, Leco, St. Joseph (USA), ausgestattet mit

- Autosampler: 7683 Series Injector, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
- Transferline: 6500 Serien Transferline, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA) und
- Massendurchfluss-Zähler: GFCS-010848 Thermal Mass-Flow Controller, Aalborg Instruments & Controls, Inc, New York (USA)

4.1.4 Software

- Open Lab CDS Chem Station, Rev. C.01.06 (61), Agilent Technologies Inc., Waldbronn (Deutschland)
- Mass Hunter Workstation Software LC/MS Data Acquisition for 6560 IM-QTOF, Version B.07.00, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
- Mass Hunter Workstation Qualitative Analysis, Version B.07.00, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
- Mass Hunter Workstation IM-MS Browser, Version B.07.01, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
- Mass Hunter Workstation IM-MS Datafile Reprocessing Utility, Version B.06.00
- Mass Hunter Workstation Profinder, Version B.06.00, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
- Mass Profiler Professional, Version B.12.05, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
- Mass Hunter Workstation Mass Profiler, Version B.07.01, Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
- GC Image, Version 2.4b-4.1, Zoex, Houston (USA)
- Microsoft Office Excel 2010
- ADC/Labs ChemSketch 2012 , Version 14.01
- CCS Datenbank der AAC, Version 1.2.0.28, Uni Duisburg-Essen, Essen (Deutschland)

4.1.5 Sonstige Geräte

- Feinwaage: CP 324S, Sartorius
- Reinstwasseranlage, Sartorius Stedim, Goettingen (Deutschland)
- Zentrifuge 25 R, AllegraTM, Beckman Coulter GmbH, Krefeld (Deutschland)
- Vortex-2-Genie, Scientific Industries Inc., New York (USA)

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

- HPLC/GC–Vials: Vial shorthead 1,5 mL, Glas, klar, VWR, Langenfeld (Deutschland)
- Schraubkappen für Kurzgewindeflaschen, blau mit PTFE-Septum, WICOM, Heppenheim (Deutschland)
- Glasvials N24, 20 mL, braun, Macherey-Nagel, Düren (Deutschland)
- Schraubkappen weiß/PTFE, Macherey-Nagel, Düren (Deutschland)
- Pipettenspitzen gelb, 1-200 µL und blau, 100-1000 µL, Ratiolab, Dreieich (Deutschland)
- Pipettenspitzen klar, Finntip® 10 mL, Thermo, Vantaa (Finnland)
- Cellstar® Tubes, 15 mL, PP, Greiner Bio-one, Frickenhausen (Deutschland)
- Einmalspritzen 1 mL SOFT-JECT®, Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen (Deutschland)
- Einmal-Kanüle, 0,90x40 mm, Braun, Melsungen (Deutschland)
- Spritzenvorsatzfilter PTFE, 0,2 µm, 25 mm, WICOM, Heppenheim (Deutschland)
- Spritzenvorsatzfilter MULTOCLEAR 0,2 µm RC 13 mm, Chromatographie Service GmbH, Langerwehe (Deutschland)

4.2 Chemikalien

Eluenten

- Methanol LC/MS grade, VWR, Leuven (Belgien)
- Acetonitril HPLC grade, VWR, Leuven (Belgien)
- Isopropanol LC/MS grade, HiPerSolv CHROMANORM, VWR, Leuven (Belgien)

Standards für den Aufbau der CCS Datenbank wurden aus verschiedenen Quellen bezogen. Colchicin (Referenzsubstanz und interner Standard) war von SIGMA ALDRICH, Steinheim (Deutschland). Standards zur Untersuchung der Trennung von Isobaren mittels IMS sowie weitere Standards von abwasserrelevanten Substanzen wurden vom Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA), Duisburg (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Weitere Standards oder Standardlösungen verschiedener Substanzklassen kamen vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucher-

schutz (LANUV) NRW, vom Arbeitskreis Prof. Scriba der Fakultät für Biologie und Pharmazie, Universität Jena und den Arbeitskreisen für Instrumentelle Analytische Chemie (IAC) sowie Prof. Meyer am Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen. Der Arbeitskreis Prof. Hayen am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Münster sowie das Chemische Veterinär- und Untersuchungsamt Münster stellten ebenfalls einige Standards zur Verfügung. Ein Kit mit 204 Pestizidstandards war von RESTEK, Bad Homburg.

Sonstige Chemikalien:

- Ameisensäure 98-100 %, Merck, Darmstadt (Deutschland)
- Ammoniumformiat, for mass spectrometry (99 %), SIGMA ALDRICH, Steinheim (Deutschland)
- ESI-L low concentration Tuning Mix (G1969-85000), Agilent Technologies, Santa Clara (USA)

4.3 Methoden

4.3.1 Kalibration des IM-qTOF-MS

Zum Tunen des Linsensystems und zur Massenkalkulation des TOF-Systems wurde der Agilent Tuning Mix verwendet und die Autotune-Funktion der Steuersoftware genutzt.

Die Bestimmung des Faktors für die Druckkorrektur (*pressure calibration factor*) für die Bestimmung von CCS nach der Stepped-Field Methode erfolgte über die Aufnahme des Tunemix bei acht verschiedenen Driftspannungen. Die Substanz mit $m/z = 922$ wurde als bekannte Referenzsubstanz ($\Omega = 243,0 \text{ \AA}^2$) herangezogen.

Die Kalibration für CCS-Bestimmungen nach der Single-Field Methode erfolgte durch einmalige Messung des Tunemix bei exakt den gleichen Bedingungen (Ionenquelle und Driftspannung), die während der anschließenden Analyse der Realproben eingestellt waren.

4.3.2 Bestimmung von CCS für die Datenbank

Die Bestimmung von CCS aus Einzelstandards erfolgte über die Stepped-Field Methode aus Lösungen ($c = 1 \text{ mg/L}$) in Wasser oder Wasser/Methanol (v/v 50/50). Die

Injektion ins IM-qTOF-MS-System erfolgte über die HPLC ohne Trennsäule mit den in Tabelle 2 aufgeführten Parametern.

Tabelle 2: Methodenparameter zur CCS-Messung von Einzelstandards mit der Stepped-Field Methode

HPLC	
Säule	keine
Laufmittel	Wasser/MeOH (v/v 50/50) mit 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	200 µL/min
Injektionsvolumen	1 oder 10 µL
 IM-qTOF-MS	
ESI Modus	Positiv und negativ
Gastemperatur	200 °C
Gasfluss	5 L/min
Nebulizer	20 psig
Sheathgastemperatur	275 °C
Sheathgasfluss	8 L/min
Nozzle Voltage	500 V
VCap	5000 V
Trap fill time	40000 µs
Trap release time	150 µs
Driftspannung	1000–1700 V (in 100 V Schritten), je 1 min lang
Driftgas	Stickstoff (3,95 torr)
Max. Driftzeit	60 ms
Massenbereich	40 – 1700 Da

4.3.3 Messungen mittels 1D-LC-IM-qTOF-MS

Die Methodenparameter für die Analyse verschiedener Realproben mit eindimensionaler HPLC-IM-qTOF-MS sind in Tabelle 3 bis Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 3: Methodenparameter zur LC-IM-qTOF-MS Analyse von Fruchtsäften

HPLC		
Säule	Phenomenex Luna 3 µm C18, 150x4,6 mm	
Laufmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: MeOH mit 0,1 % Ameisensäure	
Flussrate	300 µL/min	
Linearer Gradient	Zeit [min]	% B
	0	5
	3	5
	40	95
	45	95
Equilibrierung der Säule	5 min	
Injektionsvolumen	1 µL	
IM-qTOF-MS		
ESI Modus	Positiv	
Gastemperatur	200 °C	
Gasfluss	5 L/min	
Nebulizer	20 psig	
Sheathgastemperatur	275 °C	
Sheathgasfluss	12 L/min	
Nozzle Voltage	500 V	
VCap	5000 V	
Trap fill time	30000 µs	
Trap release time	150 µs	
Driftspannung	1700	
Driftgas	Stickstoff (3,95 torr)	
Max. Driftzeit	40 ms	
Massenbereich	100 – 1700 Da	

Tabelle 4: Methodenparameter zur LC-IM-qTOF-MS Analyse von *Castanea sativa*

HPLC		
Säule	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 3,5 µm C18 Rapid Resolution, 4,6x100 mm	
Laufmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: MeOH mit 0,1 % Ameisensäure	
Flussrate	500 µL/min	
Linearer Gradient	Zeit [min]	% B
	0	5
	5	5
	35	95
	40	95
Equilibrierung der Säule	10 min	
Injektionsvolumen	10 µL	
IM-qTOF-MS		
ESI Modus	Negativ	
Gastemperatur	250 °C	
Gasfluss	5 L/min	
Nebulizer	30 psig	
Sheathgastemperatur	275 °C	
Sheathgasfluss	12 L/min	
Nozzle Voltage	500 V	
VCap	5000 V	
Trap fill time	30000 µs	
Trap release time	150 µs	
Driftspannung	1700	
Driftgas	Stickstoff (3,95 torr)	
Max. Driftzeit	50 ms	
Massenbereich	50 – 1700 Da	

Tabelle 5: Methodenparameter zur LC-IM-qTOF-MS Analyse von lipidhaltigen Proben

HPLC		
Säule	Phenomenex Kinetex 2,6 µm C18, 100 x 3 mm	
Laufmittel	A: Acetonitril/Wasser (v/v 3/2), 0,1 % Ameisen- säure, 10 mM Ammoniumformiat B: Isopropanol/Acetonitril (v/v 9/1), 0,1 % Amei- sensäure, 10 mM Ammoniumformiat	
Flussrate	300 µL/min	
Linearer Gradient	Zeit [min]	% B
	0	30
	2	30
	3	56,1
	4	58,3
	5,5	60,2
	7	60,6
	8,5	62,3
	10	64
	11,5	64,5
	13	66,2
	14,5	66,9
	15	100
	19	100
	19,1	5
	22	5
	22,1	30
	24	30
Equilibrierung der Säule	5 min	
Injektionsvolumen	5 µL	
IM-qTOF-MS		
ESI Modus	Positiv und Negativ	
Gastemperatur	200 °C	

Gasfluss	5 L/min
Nebulizer	20 psig
Sheathgastemperatur	325 °C
Sheathgasfluss	12 L/min
Nozzle Voltage	500 V
VCap	5000 V
Trap fill time	30000 µs
Trap release time	150 µs
Driftspannung	1700
Driftgas	Stickstoff (3,95 torr)
Max. Driftzeit	80 ms
Massenbereich	100 – 1700 Da

Tabelle 6: Methodenparameter zur LC-IM-qTOF-MS Analyse von Abwasser

HPLC		
Säule	Phenomenex Kinetex C18 2,6 µm, 100x3,0 mm	
Laufmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: MeOH mit 0,1 % Ameisensäure	
Flussrate	500 µL/min	
Linearer Gradient	Zeit [min]	% B
	0	5
	3	5
	23	90
	28	90
Equilibrierung der Säule	10 min	
Injektionsvolumen	20 µL	
IM-qTOF-MS		
ESI Modus	Positiv	
Gastemperatur	200 °C	
Gasfluss	5 L/min	
Nebulizer	20 psig	

Sheathgastemperatur	325 °C
Sheathgasfluss	12 L/min
Nozzle Voltage	500 V
VCap	5000 V
Trap fill time	30000 µs
Trap release time	150 µs
Driftspannung	1700
Driftgas	Stickstoff (3,95 torr)
Max. Driftzeit	50 ms
Massenbereich	50 – 1700 Da

4.3.4 Messungen mittels LC+LC-qTOF und LC+LC-IM-qTOF-MS

Tabelle 7 enthält die Methodenparameter zur Analyse von Realproben mit der LC+LC-IM-qTOF-MS. Bei qTOF-only Messungen wurden die Ionen vor der IMS-Driftröhre nicht gesammelt; alle anderen Einstellungen wurden gleich gehalten. Die Gradienten der ersten und zweiten Dimension sind zusätzlich in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

Tabelle 7: Methodenparameter zur LC+LC-IM-qTOF-MS-Analyse verschiedener Realproben

HPLC		
Erste Dimension		
Säule	Phenomenex Luna CN 3,0 µm, 150x2,0 mm	
Laufmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: ACN	
Flussrate	100 µL/min	
Linearer Gradient	Zeit [min]	% B
	0	5
	50	5
	100	80
	119	80
	120	5

Zweite Dimension

Säule	Phenomenex Kinetex C18 2,6 µm, 50x3,0 mm		
Laufmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: MeOH mit 0,1 % Ameisensäure		
Flussrate	500 µL/min		
Shift Gradient	Zeit [min]	% B (1. Modulation)	% B (letzte Modulation)
	0	10	50
	2,5	60	90
	3,16	60	90
	3,17	11,1	51,1
	4,0	11,1	51,1

Equilibrierung der Säulen	10 min
Injektionsvolumen	20 µL
Dilute-and-Split	Verdünnung 1:4 mit Wasser + 0,1 % Ameisensäure; Split im Verhältnis 1:20; reguliert über zusätzliche Pumpe

IM-qTOF-MS

ESI Modus	Positiv
Gastemperatur	200 °C
Gasfluss	5 L/min
Nebulizer	20 psig
Sheathgastemperatur	325 °C
Sheathgasfluss	12 L/min
Nozzle Voltage	500 V
VCap	5000 V
Trap fill time	30000 µs
Trap release time	150 µs
Driftspannung	1700

Driftgas	Stickstoff (3,95 torr)
Max. Driftzeit	50 ms
Massenbereich	50 – 1700 Da

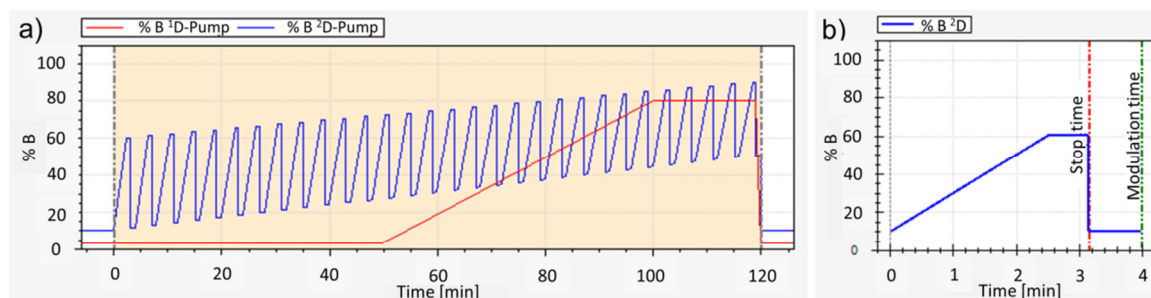


Abbildung 11: a) Linearer Gradient der ersten Dimension (rot) und Shift Gradient der zweiten Dimension (blau) bei der LC+LC-Methode. b) Einzelner Gradient über 4 Minuten in der zweiten Dimension während der ersten Modulation im Detail.

4.3.5 Messungen mittels GC-APCI-IM-qTOF-MS

Die GC-APCI-Ionenquelle wurde durch einen zusätzlichen Stickstoffstrom (Make-up Gas), der die GC-Kapillare in der Transferline umgibt, modifiziert. Dazu wurde direkt vor der Transferline ein T-Stück angebracht und Stickstoff über einen Massendurchfluss-Zähler zugeführt (s. Abbildung 12). Die zur Analyse des *Ginkgo biloba* Extrakts verwendeten Methodenparameter sind in Tabelle 8 aufgeführt.

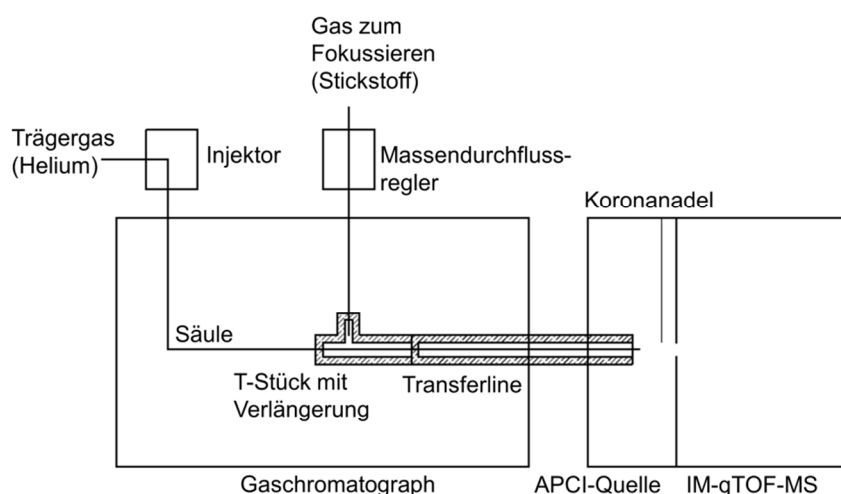


Abbildung 12: Aufbau der modifizierten GC-APCI-Ionenquelle mit zusätzlichem Stickstoffstrom

Tabelle 8: Methodenparameter zur GC-IM-qTOF-MS-Analyse von *Ginkgo biloba*

GC

Säule	Agilent Technologies HP-5-MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 µm)
Trägergas	Helium
Konstanter Fluss	1 L//min
Temperaturprogramm	Starttemperatur 50 °C – 0,2 min halten, Heizen mit 10 °/min bis auf 300 °C – 1 min halten
Injektionsvolumen	0,2 µL
Make-up Gas	0,2 L/min Stickstoff
Transferline	280 °C

APCI-IM-qTOF-MS

APCI Modus	Positiv
Koronastrom	1 µA
Gastemperatur	365 °C
Gasfluss	5 L/min
VCap	1000 V
Trap fill time	20000 µs
Trap release time	150 µs
Driftspannung	1700
Driftgas	Stickstoff (3,95 torr)
Max. Driftzeit	50 ms
Massenbereich	50 – 1000 Da

4.4 Probenvorbereitung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Realproben vorbereitet und gemessen. Im Folgenden werden die einzelnen Proben mit der jeweiligen Probenvorbereitung beschrieben.

4.4.1 Fruchtsaft

Die Zitronensaft- und Orangensaftproben wurden direkt nach dem Öffnen zum Abtrennen des Fruchtfleischs zentrifugiert und der Überstand durch einen Spritzenvorsatzfilter membranfiltriert. Vor der Analyse wurde im Verhältnis 1:10 mit Wasser/Methanol (v/v 95/5) verdünnt.

4.4.2 *Castanea sativa*

Frische Blätter der Pflanze *Castanea sativa* wurden in Moers (Deutschland) gesammelt. Für den wässrigen Extrakt wurden die Blätter in kleine Stücke zerschnitten und 4,13 g davon in 200 mL Wasser bis zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Extrakt membranfiltriert und direkt vermessen. Zur Herstellung des methanolischen Extrakts wurden die Blätter gefriergetrocknet und homogenisiert. 300 mg davon wurden mit 3 mL Methanol im Ultraschallbad 40 Minuten lang extrahiert. Nach Zentrifugation und Membranfiltration wurde der Extrakt bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Direkt vor der Analyse wurde der methanolische Extrakt 1:10 (v/v) mit Wasser verdünnt.

4.4.3 OP9 Zellextrakt

Der Lipidextrakt wurde vom Leibniz-Institut für analytische Wissenschaften in Dortmund zur Verfügung gestellt [200]. Der Extrakt wurde in Trichlormethan/Methanol/Wasser (v/v/v 60/30/4,5) bei -80 °C gelagert. Vor den Messungen wurden 100 µL des Extraktes in ein Vial überführt. Dort wurde im Stickstoffstrom das Lösungsmittel verdampft und die Probe anschließend in 1 mL einer Lösung von Isopropanol/Acetonitril (v/v 9/1) mit 0,1 % Ameisensäure und 10 mM Ammoniumformiat aufgenommen.

4.4.4 Olivenöl

Von einem handelsüblichen Olivenöl wurde eine Lösung in Isopropanol/Acetonitril (v/v 9/1) mit 0,1 % Ameisensäure und 1 mM Ammoniumformiat mit einer Konzentration von 1 g/L angesetzt. Diese Lösung wurde durch einen PTFE Spritzenvorsatzfilter membranfiltriert.

4.4.5 Eigelb

Die Extraktion von Lipiden aus Eigelb erfolgte aus frischen Eiern aus dem Einzelhandel. Von drei Eiern wurde das Eigelb vom Eiklar getrennt und homogenisiert. 55 mg

Eigelb wurden mit 3 mL Methanol/Dichlormethan (v/v 2/1) versetzt und gut durchmischt. Nach 20 Minuten wurden 1 mL Dichlormethan (DCM) und 1,8 mL Wasser hinzugegeben und nach Durchmischen für 5 Minuten bei 4100 rpm zentrifugiert. Die untere Phase (DCM) wurde in ein Vial überführt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 mL Isopropanol/Acetonitril (v/v 9/1) mit 0,1 % Ameisensäure und 10 mM Ammoniumformiat aufgenommen.

4.4.6 *Ginkgo biloba*

Frische Blätter von *Ginkgo biloba* wurden in Essen (Deutschland) gesammelt, bei 60 °C getrocknet und fein gemahlen. 300 mg davon wurden mit 3 mL im Ultraschallbad 40 Minuten lang extrahiert. Nach Zentrifugation und Membranfiltration wurde der Extrakt bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Direkt vor der Analyse wurde der methanolische Extrakt 1:10 (v/v) mit Wasser verdünnt. Der interne Standard Colchicin wurde mit einer endgültigen Konzentration von 100 µg/L zugegeben.

Die Herstellung des Dichlormethanextrakts für die Messung mit GC-APCI-IM-qTOF-MS erfolgte analog mit 300 mg getrockneten Blättern in 3 mL Dichlormethan im Ultraschallbad für 40 Minuten und anschließender Filtration.

4.4.7 Kaffee

Kaffee wurde mit einer handelsüblichen Espressomaschine (Saeco, Deutschland) zubereitet und nach dem Abkühlen membranfiltriert.

4.4.8 Abwasser

Die untersuchte Abwasserprobe wurde im Februar 2015 im Klärwerk Vierlinden, Duisburg (D), genommen, im Arbeitskreis für Instrumentelle Analytische Chemie, Universität Duisburg-Essen, vorbereitet und für die Analyse zur Verfügung gestellt. Dabei wurde eine Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion mit zwei Kartuschen (Oasis MAX und Oasis MCX) durchgeführt. Die Kartuschen wurden 2 mal mit 3 mL Methanol und 2 mal mit 3 mL Wasser konditioniert und hintereinander geschaltet. 1 L der Abwasserprobe wurde durch ein Glasfaserfilter (GF/F, 0,7 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser) filtriert. Die Extraktion erfolgte über eine Vakuumapparatur bei einem Durchfluss von ca. 15 mL/min. Anschließend wurden die Kartuschen 30 Minuten unter Vakuum getrocknet. Die Oasis MAX Kartusche wurde mit 2 mL Wasser/Ammoniak (v/v 95/5) gewaschen und mit 6 mL Metha-

nol/Ethylacetat/Ameisensäure (v/v 69/29/2) eluiert. Zum Waschen der Oasis MCX Kartusche wurden 2 mL Wasser/Ameisensäure (v/v 98/2) und zur Elution 6 mL Methanol/Ethylacetat/Ammoniak (v/v 67,5/27,5/5) verwendet. Die Eluate beider Kartuschen wurden vereinigt, das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und die Lösung mit Wasser auf 1 mL aufgefüllt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Bestimmung von Collision Cross Sections und Aufbau einer Datenbank

Es wurden Collision Cross Section (CCS) Daten für eine Vielzahl an Standardsubstanzen mittels Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometrie (IM-qTOF-MS) aufgenommen. Das Vorgehen bei der Messung dieser Werte und die Zusammenstellung in einer Datenbank werden im Folgenden beschrieben.

5.1.1 Bestimmung von CCS nach der Stepped-Field Methode und der Single-Field Methode

Die Berechnung von CCS-Werten kann bei der hier eingesetzten Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometrie nach Mason-Schamp nach Gleichung 10 direkt aus der Driftzeit erfolgen. Da die gemessene Zeit jedoch der Zeit entspricht, die die Ionen vom Eingang der Driftröhre bis zum Auftreffen am Detektor benötigen und nicht der tatsächlichen Zeit zum Passieren der Driftröhre, muss eine zusätzliche Korrektur durchgeführt werden. Dies kann mittels der Gerätesoftware nach zwei Verfahren erfolgen: Entweder durch die Bestimmung und anschließende Subtraktion der Zeit, in der ein Ion die Ionenoptik hinter der Driftröhre passiert (Stepped-Field Methode) oder durch eine Kalibration des Systems mit bekannten Standards, die auf der Beziehung nach Mason-Schamp beruht (Single-Field Methode). Hierbei ist es nicht notwendig, dass die Standards eine ähnliche Struktur wie die der Analyten aufweisen.

5.1.1.1 Bestimmung von CCS nach der Stepped-Field Methode

Die Bestimmung von CCS Daten für den Aufbau einer Datenbank erfolgte aus Einzelstandards oder Standardgemischen nach der sogenannten Stepped-Field Methode. Dabei wird ein Analyt mehrfach (hier wenn nicht anders angegeben achtmal) in das IM-qTOF-MS System injiziert und dabei jeweils die Spannung am Eingang der Driftröhre V_1 variiert, sodass sich unterschiedliche elektrische Feldstärken E ergeben.

$$E = \frac{\Delta V}{L} = \frac{V_1 - V_2}{L}$$

Gleichung 25

Dabei ist ΔV die Differenz der Spannungen am Eingang (V_1) und am Ausgang (V_2) der Driftröhre und L die Länge der Driftröhre. Für jede Messung wird zunächst für ein

Ion mit bestimmtem m/z -Verhältnis die gesamte Driftzeit t_{ges} ermittelt. Diese setzt sich zusammen aus der tatsächlichen Driftzeit t_d , die das Ion benötigt, um die Drift-röhre zu passieren, und der Zeit t_0 , in der das Ion durch die weitere Optik des Instru-ments bis zum Detektor gelangt:

$$t_{ges} = t_d + t_0$$

Gleichung 26

Aus Messungen bei mehreren (mindestens zwei) verschiedenen elektrischen Feld-stärken kann t_0 bestimmt werden, indem t_{ges} gegen $1/\Delta V$ aufgetragen wird [131]. Bei unendlich großer Driftspannung geht $1/\Delta V$ gegen Null und t_d wird unendlich klein, sodass der y-Achsenabschnitt der Geraden t_0 entspricht (s. Beispiel in Abbildung 13). Nach Umstellen von Gleichung 26 wird für jede Messung die tatsächliche Driftzeit t_d als Differenz zwischen t_{ges} und t_0 berechnet. Durch Einsetzen von t_d und E sowie der anderen, während der Messung konstanten Parameter wie Druck und Temperatur in die Mason-Schamp Gleichung (Gleichung 10) wird anschließend für jede Injektion einzeln die CCS berechnet. Dabei muss zusätzlich ein täglich über eine bekannte Referenzsubstanz ermittelter Faktor für die Druckkorrektur (*pressure calibration fac-tor*) einbezogen werden, so lange technisch bedingt keine korrekte Druckmessung möglich ist [201].

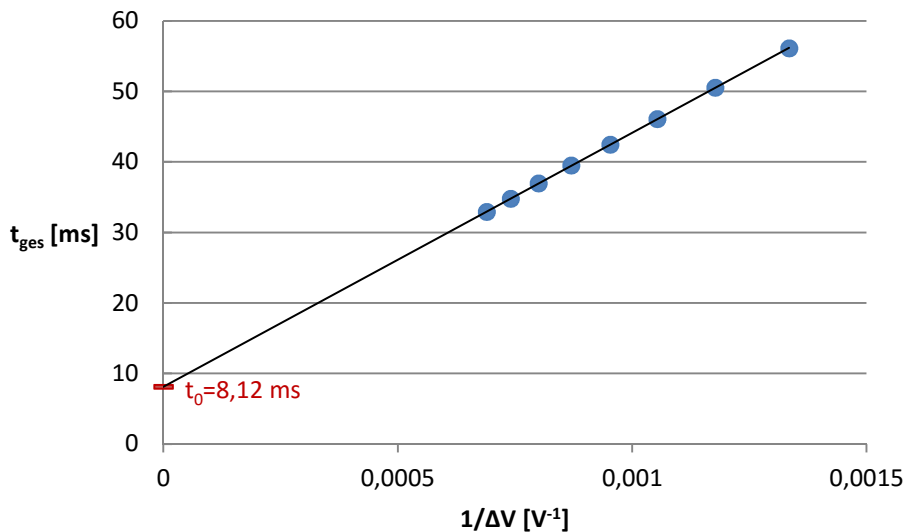


Abbildung 13: Plot von t_{ges} gegen $1/\Delta V$ für ein Ion mit $m/z = 922,0107$; t_0 ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden

Der CCS-Wert (Ω) wird als Mittelwert mit Standardabweichung aus diesen Mehrfachbestimmungen angegeben. Da in dieser Arbeit ausschließlich Stickstoff als Driftgas verwendet wurde, stellen der Einfachheit halber, wenn nicht anders angegeben, alle mit Ω abgekürzten Werte Collision Cross Sections in Stickstoff (Ω_{N_2}) dar.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurde als Standardsubstanz Colchicin (Strukturformel s. Abbildung 14) ausgewählt, dessen Collision Cross Section bereits in der Literatur bekannt ist [134]. Für die Messung bei acht verschiedenen Feldstärken wurde in Abständen von einer Minute je 1 μ L von einer Standardlösung mittels des Autosamplers der HPLC (jedoch ohne Chromatographiesäule) injiziert. Die Spannung am Eingang der Driftröhre (im Weiteren kurz als „Driftspannung“ bezeichnet) wurde dabei innerhalb von 8 Minuten zwischen 1000 und 1700 V in Stufen von 100 V (je eine Minute lange Zeitsegmente) variiert. Mit einer konstanten Spannung am Ausgang der Driftröhre von 250 V und einer Länge von 78 cm ergaben sich so nach Gleichung 25 elektrische Feldstärken zwischen 9,6 und 18,6 V/cm. Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde die CCS sowohl für das $[M+H]^+$ - als auch für das $[M+Na]^+$ -Addukt von Colchicin insgesamt zehnmal an verschiedenen Tagen gemessen. Die vollständige Tabelle mit den berechneten Werten befindet sich im Anhang (Tabelle 21, S. 105). Als Mittelwert aus den zehn Messungen ergab sich $\Omega = 196,8 \text{ \AA}^2$ für das $[M+H]^+$ -Addukt mit einer relativen Standardabweichung (RSD) von 0,14 % und für das Natriumaddukt $\Omega = 202,4 \text{ \AA}^2$ (RSD = 0,14 %). Die geringen relativen Standardabweichungen zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der CCS-Bestimmung von Tag zu Tag an. Die Verteilung der gemessenen Werte für das $[M+H]^+$ -Addukt von Colchicin ist in Abbildung 15 dargestellt. Eingezeichnet ist zudem der Mittelwert in blau und die Grenzen von $\pm 0,5 \%$ und $\pm 1,0 \%$ um den Mittelwert als gelbe bzw. rote Linien. Der Hersteller gibt dazu an, dass CCS mit einer Genauigkeit von etwa 1 % bestimmt werden können [54]. Es ist zu erkennen, dass alle Werte innerhalb des Bereiches von $\pm 0,5 \%$ liegen. Damit kann festgestellt werden, dass das Verfahren eine gute Präzision aufweist und vergleichbar mit den Ergebnissen in [28] ist, die mit dem gleichen System erzielt wurden. Auf Grundlage dieser Daten wurde eine Kontrollkarte erstellt.

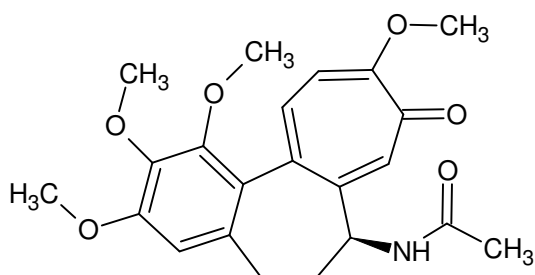


Abbildung 14: Strukturformel von Colchicin

Colchicin wird an jedem weiteren Messtag als Referenzstandard zur Überprüfung des Systems mit bestimmt und in diese Kontrollkarte eingetragen. Bei der späteren Anwendung der Datenbank zur Identifizierung unbekannter Substanzen kann eine Abweichung von maximal $\Delta\Omega = \pm 1\%$ angenommen werden.

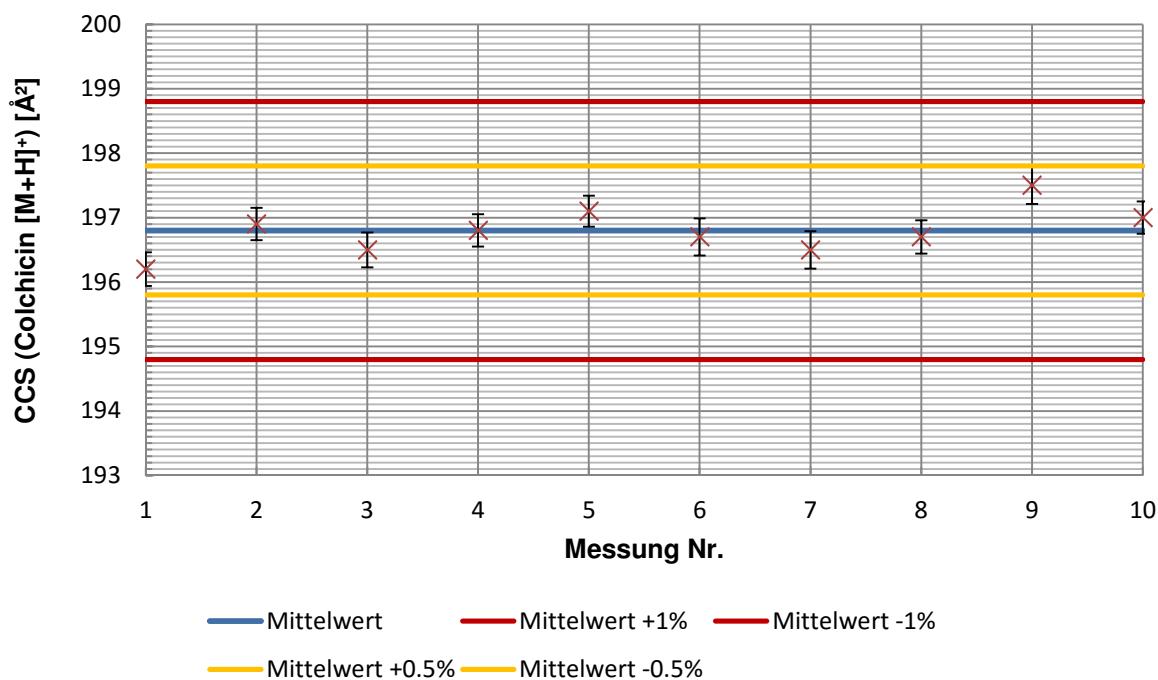


Abbildung 15: CCS-Werte für das [M+H]⁺-Addukt von Colchicin aus zehn unabhängigen Messungen

Da wie oben erwähnt für die Ermittlung von CCS nach der Stepped-Field Methode theoretisch Messungen bei zwei verschiedenen elektrischen Feldstärken ausreichen würden, soll im Folgenden die Anwendung von unterschiedlichen Kombinationen an Driftspannungen untersucht werden, um möglicherweise die Analysenzeit von 8 Minuten, die bei der aktuellen Methode erforderlich ist, zu verkürzen. Dafür wurde wieder Colchicin als Standardsubstanz herangezogen und zunächst bei acht verschiedenen Driftspannungen gemessen. Variiert wurde dabei die Spannung am Ein-

gang der Driftröhre zwischen 1000 V und 1700 V in 100 V Schritten. Zur Auswertung wurden anschließend Kombinationen aus zwei oder drei Driftspannungen herangezogen. Die so berechneten CCS-Werte werden in Tabelle 9 mit dem bereits bestimmten Mittelwert aus 10 gesonderten Bestimmungen von Colchicin, die jeweils über acht Driftspannungen durchgeführt wurden ($\Omega = 196,8 \text{ Å}^2$), und einem Literaturwert ($\Omega = 196,2 \text{ Å}^2$, [134]) verglichen. Aus Tabelle 9 geht hervor, dass die Abweichungen größer sind, wenn die ausgewählten Driftspannungen relativ nah beieinander und eher am Rand des gesamten Bereiches liegen. So betragen die Abweichungen vom CCS-Wert der achtfachen Bestimmung immer mehr als -1 %, wenn Kombinationen aus zwei oder drei Driftspannungen ausschließlich im hohen (1500 bis 1700 V) Bereich verwendet werden oder mehr als +1 % bei Kombinationen im niedrigen Bereich (1000 bis 1200 V). Liegen die Spannungen dagegen im mittleren Bereich (1200 bis 1400 V), werden Abweichungen unter 1 % erreicht.

Tabelle 9: Vergleich der CCS (Ω) von Colchicin berechnet nach der Stepped-Field Methode über verschiedene Kombinationen an Driftspannungen und Vergleich mit der Literatur

Kombi- nation	Drift- spannung [V]	Ω [Å ²]	SD [Å ²]	Δ (Ω aus 8 Drift- spannungen) [%]	Δ (Ω Lit.) [%]
1	1000,1100,1200	194,2	0,06	1,3	1,0
2	1300,1400,1500	197,8	0,07	-0,5	-0,8
3	1500,1600,1700	199,8	0,03	-1,5	-1,8
4	1000,1400,1700	196,3	0,39	0,3	-0,1
5	1000,1300,1700	196,4	0,37	0,2	-0,1
6	1100,1400,1700	197,4	0,27	-0,3	-0,6
7	1000,1100	193,5		1,7	1,4
8	1200,1300	197,2		-0,2	-0,5
9	1400,1500	199,4		-1,3	-1,6
10	1600,1700	199,1		-1,2	-1,5
11	1000,1700	196,5		0,2	-0,2
12	1000,1200	194,3		1,3	1,0
13	1500,1700	199,8		-1,5	-1,8
14	1300,1400	196,6		0,1	-0,2

Die Gründe für diese Abweichungen liegen in der Störung der Driftspannung durch die elektrischen Felder des *Trap Funnels* und des *Rear Funnels* am Anfang bzw. am Ende der Driftröhre. Deshalb sollen in einer zukünftigen Firmwareversion diese Einflüsse korrigiert werden [persönliche Mitteilung J. Fjeldsted, Agilent Technologies]. Die Ergebnisse mit den insgesamt geringsten Abweichungen werden erhalten, wenn Driftspannungen aus dem hohen und dem niedrigen Bereich kombiniert werden, so dass ein möglichst großer Bereich aufgespannt wird. Aufgrund dieser Beobachtungen und um für den Aufbau der CCS Datenbank eine höhere Sicherheit zu erzielen, wurden für alle weiteren Messungen mit der Stepped-Field Methode trotz der etwas längeren Analysenzeit immer acht Driftspannungen zwischen 1000 und 1700 V verwendet. Die CCS Bestimmung von bisher mehr als 500 Substanzen erfolgte aus Einzelstandards oder Gemischen analog zu dem oben für Colchicin beschriebenen Verfahren, wobei jeweils im positiven und im negativen ESI Modus alle beobachteten Addukte ausgewertet wurden. Einen Überblick über die Vergleichbarkeit der mit diesem System ermittelten CCS mit anderen bereits in der Literatur veröffentlichten Daten gibt Tabelle 10. Alle Abweichungen sind geringer als 1 %.

Tabelle 10: Ermittelte CCS-Werte für ausgewählte Substanzen und Vergleich mit Literaturwerten

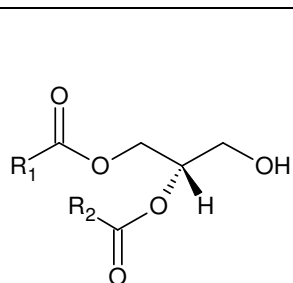
Substanz	Addukt	Ω [\AA^2]	s [\AA^2]	Ω (Literatur) [\AA^2]	Literatur	Abweichung [%]
Fructose	Na^+	142,3	0,18	143,4	[202]	- 0,8
Sorbitol	Na^+	143,0	0,16	142,7	[202]	+ 0,2
Phenylalanin	H^+	142,2	0,15	140,9	[202]	+ 0,9
Colchicin	H^+	196,3	0,27	196,2	[134]	+ 0,1
Verapamil	H^+	209,1	0,23	210,0	[134]	+ 0,4
Omethoat	H^+	136,6	0,17	136,8	[135]	- 0,1
Acephat	Na^+	141,3	0,18	140,4	[135]	+ 0,6
Palmitinsäure	H^+	171,3	0,17	170	[78]	+ 0,8
Stearinsäure	H^+	179,2	0,34	178	[78]	+ 0,7

Weiterhin wurden CCS-Werte für eine Vielzahl an Lipiden bestimmt. Diese lagen jedoch nicht als Reinsubstanzen zur Analyse vor, sondern als ein Gemisch verschiede-

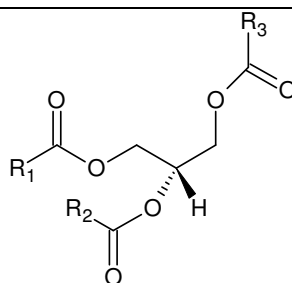
dener Lipidklassen aus einem Zelllysate von OP9 Stammzellen. Das Zelllysate wurde am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften (ISAS – e.V.) in Dortmund aufgearbeitet und dort mittels hochauflösender Massenspektrometrie umfassend charakterisiert, sodass 287 in der Probe vorliegende Lipide bekannt waren. Dabei waren unterschiedliche Glycerolipide, Glycerophospholipide und Sphingolipide vertreten. Eine Übersicht über die Klassifizierung und die Strukturen dieser Lipide zeigt Tabelle 11. Es waren aber immer nur Angaben zur Zusammensetzung eines Lipids vorhanden (z.B. TAG 56:4 – Triglycerid mit 56 Kohlenstoffatomen und 4 Doppelbindungen), wobei mehrere Isomere möglich sind. Die zuvor identifizierten Lipide konnten über ihre exakte Masse zugeordnet und so aus dieser Probe CCS für einzelne Ionen bestimmt werden. Da bei der Analyse eines so komplexen Gemisches nach der bisher für Einzelstandards angewendeten Methode sowohl durch Ionensuppression als auch durch sich überlagernde Signale von Substanzen ähnlicher Massen Probleme auftreten könnten, wurde dieses Gemisch vor der Analyse mittels IM-qTOF-MS über eine HPLC-Säule getrennt. Die Driftspannung wurde während der gesamten Laufzeit des Gradienten von 30 Minuten (inklusive Equilibrierungszeit) konstant gehalten und die Probe anschließend erneut unter sonst gleichen Bedingungen bei einer anderen Driftspannung injiziert. Es wurden acht Analysenläufe bei Driftspannungen zwischen 1000 und 1700 V durchgeführt. Über extrahierte Ionenchromatogramme mit den m/z-Verhältnissen der bekannten Lipide wurden jeweils die Peaks in allen acht Analysen gesucht und die entsprechenden Driftzeiten ermittelt. Die anschließende Berechnung

Tabelle 11: Strukturen der untersuchten Lipidklassen

Glycerolipide

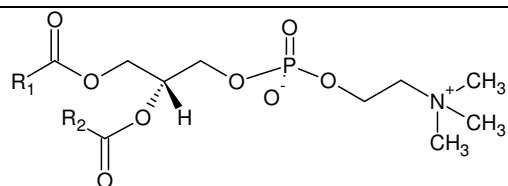


Diglycerid (DG)

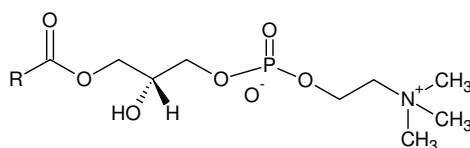


Triglycerid (TAG)

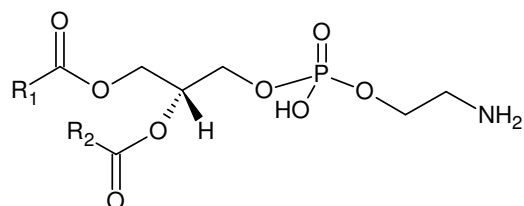
Glycerophospholipide



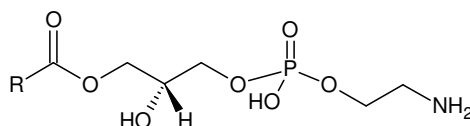
Phosphatidylcholin (PC)



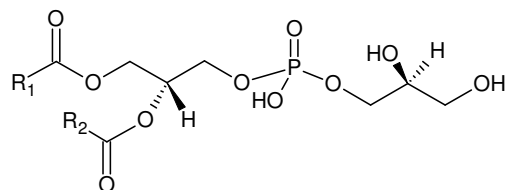
Lysophosphatidylcholin (LPC)



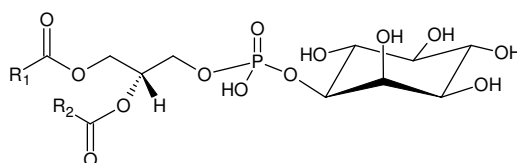
Phosphatidylethanolamin (PE)



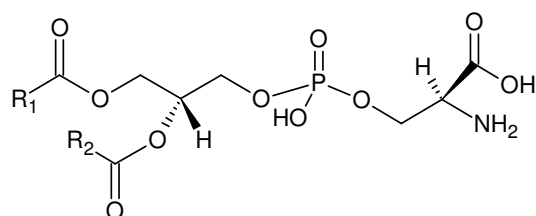
Lysophosphatidylethanolamin (LPE)



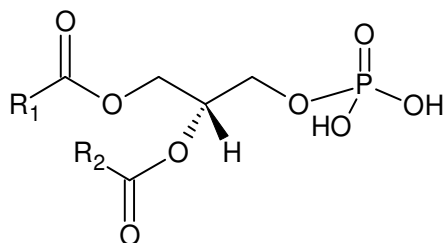
Glycerophosphoglycerol (PG)



Phosphatidylinositol (PI)

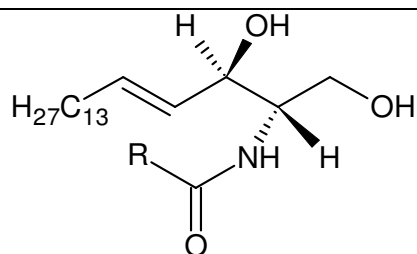


Phosphatidylserin (PS)

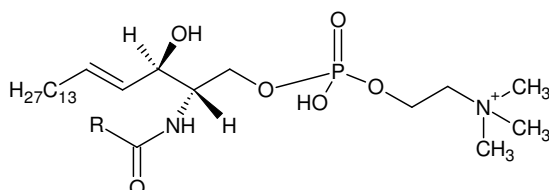


Diacylglycerophosphat (PA)

Sphingolipide



Ceramid (CER)



Sphingomyelin (SM)

der CCS erfolgte wie oben nach der Stepped-Field Methode. Dabei wurden zwar in einigen Fällen Isomere nach Retentionszeiten getrennt, die auch geringfügige Unterschiede in ihren Driftzeiten zeigten, jedoch war es aufgrund der bekannten Informationen über die Probe nicht möglich, einzelne Isomere zuzuordnen. Zudem waren die Unterschiede in den CCS dabei so gering, dass eine Unterscheidung der Isomere nicht möglich wäre. Es wurde deshalb für jedes Lipid ein CCS-Wert aus einer mittleren Driftzeit berechnet. In Abbildung 16 sind die im positiven ESI Modus erhaltenen CCS-Werte gegen das jeweilige m/z -Verhältnis aufgetragen. Dabei sind Trendlinien einzelner Lipidklassen unterscheidbar. So weisen Phosphatidylserine (PS), die zur Untergruppe der Glycerophospholipide zählen, bei gleicher Masse grundsätzlich eine kompaktere Struktur und geringere CCS-Werte auf als Sphingomyeline (SM) aus der Gruppe der Spingolipide. Dieser Trend wurde auch von McLEAN beobachtet [203].

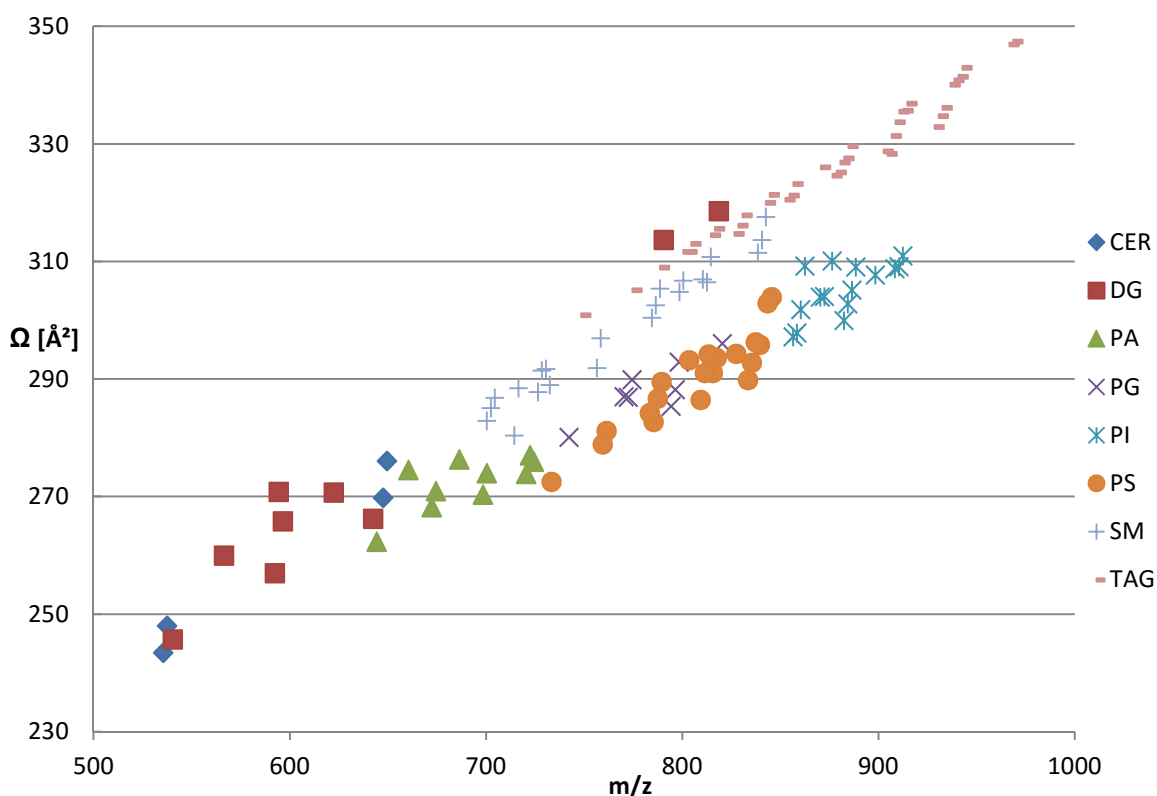


Abbildung 16: Plot von CCS gegen m/z der bestimmten Lipide im positiven ESI Modus; CER: Ceramide, DG: Diglyceride, PA: Diacylglycerophosphate, PG: Glycerophosphoglycerol, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserine, SM: Sphingomyeline, TAG: Triglyceride

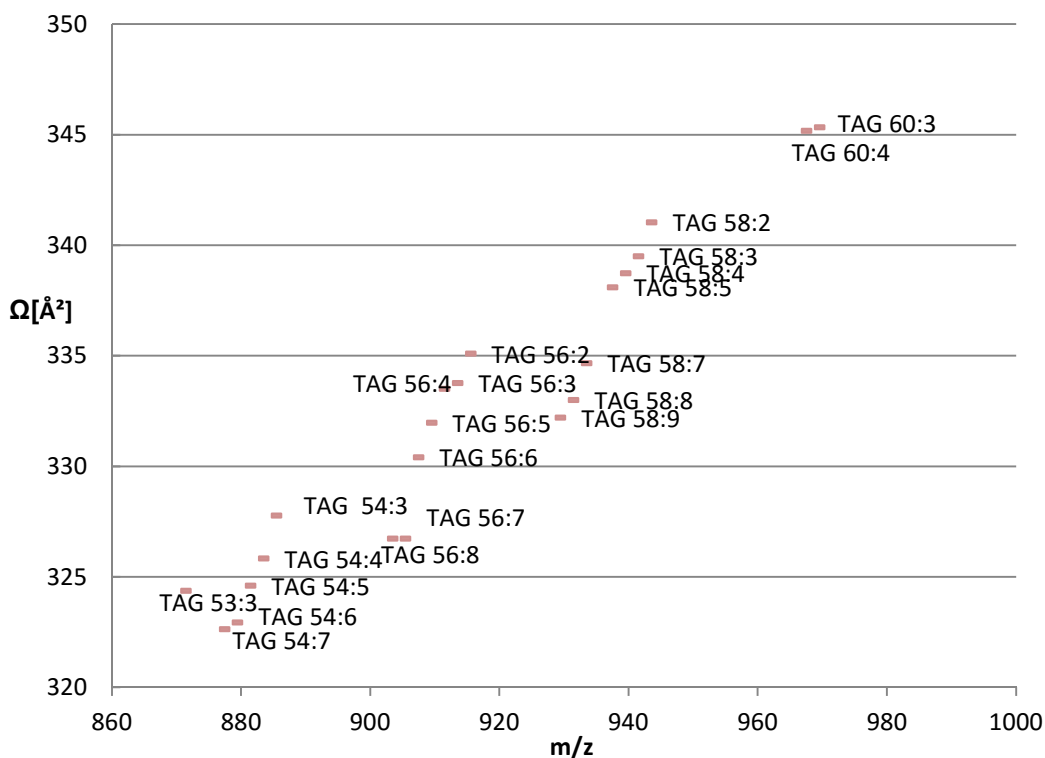


Abbildung 17: Plot von CCS gegen m/z der bestimmten Lipide im positiven ESI Modus; Ausschnitt im Bereich der Triglyceride (TAG)

Triglyceride (TAG) haben im Vergleich zu anderen Gruppen eine relativ große räumliche Ausdehnung im Verhältnis zu ihrer Masse. Innerhalb einzelner Lipidklassen lassen sich zudem einzelne Gruppen erkennen, in denen die Anzahl an Kohlenstoffatomen gleich ist und nur die Zahl der Doppelbindungen variiert. Besonders deutlich wird dies bei den Triglyceriden, wie der vergrößerte Ausschnitt in Abbildung 17 zeigt. Innerhalb der Gruppe mit 58 Kohlenstoffatomen nimmt die Masse mit steigender Anzahl an Doppelbindungen von TAG 58:2 zu TAG 58:9 jeweils um 2 Da ab, da zwei Wasserstoffatome weniger im Molekül enthalten sind. Der veränderte Bindungswinkel, der durch die in der Natur hauptsächlich vorkommenden *cis*-Doppelbindungen entsteht, sorgt dafür, dass die räumliche Gestalt und damit der gemessene CCS-Wert bei gleichbleibender Länge der C-Kette kleiner wird. Bei negativ geladenen Ionen der Lipide ergibt sich ein ähnliches Bild (s. Abbildung 37 im Anhang 106). Generell können die Lipide also aufgrund ihrer CCS-Werte in Trendlinien, die den verschiedenen Lipidklassen entsprechen, eingeordnet werden, was einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung lipidhaltiger Proben leisten kann [204–206].

5.1.1.2 Bestimmung von CCS nach der Single-Field Methode

Da die Messung und Auswertung nach der Stepped-Field Methode durch die Einstellung mehrerer Feldstärken relativ aufwendig ist und bei der Analyse von Realproben vor allem bei einer längeren chromatographischen Trennung sehr viel Zeit in Anspruch nehmen würde, soll eine weitere Methode zur Berechnung von Collision Cross Sections direkt aus der Driftzeit bei einer einzigen elektrischen Feldstärke implementiert werden (Single-Field Methode). Bei der Single-Field Methode erfolgt vor der eigentlichen Messung eine Kalibration mit einem bekannten Tunemix. Dieser Mix muss unter exakt gleichen Bedingungen (elektrische Feldstärke, Druck, Ionenquellenparameter) injiziert werden wie die anschließend zu messende Probe. Aus den so erhaltenen Driftzeiten und den bekannten CCS und Massen der einzelnen im Tunemix enthaltenen Substanzen ergibt sich eine Gerade mit folgender Gleichung, die gemäß [135] direkt aus der Mason-Schamp Gleichung hergeleitet werden kann:

$$t_{ges} = \gamma\beta\Omega + t_{Fix}$$

Gleichung 27

Dabei ist t_{ges} die gemessene Driftzeit, β ist ein instrumentenabhängiger Proportionalitätskoeffizient, der vom Druck, dem elektrischen Feld und Einstellungen der Ionenoptik abhängt, γ ist ein modifizierter Koeffizient für die reduzierte Masse und t_{Fix} ist ein mobilitätsunabhängiger Beitrag zur Flugzeit außerhalb der Driftröhre [135], der sich nur aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden, wie in Abbildung 18 gezeigt, als ein Wert nahe Null ergibt. γ kann für jedes Ion berechnet werden als:

$$\gamma = \frac{1}{z} \sqrt{\frac{m_A}{m_A + m_B}}$$

Gleichung 28

Die Parameter β und t_{Fix} werden anhand der Kalibration wie in Abbildung 18 zu erkennen aus der Steigung bzw. dem y-Achsenabschnitt bestimmt. Nach der Messung einer Probe unter gleichen Bedingungen kann durch Einsetzen von γ und der Driftzeit t_{ges} eines Analytens in Gleichung 27 und Auflösen nach Ω dessen CCS berechnet werden. Da die Geradengleichung in direktem Zusammenhang zur Mason-

Schamp-Gleichung steht, handelt es sich bei dieser Art der Kalibration, anders als bei Messungen mit TWIMS, um eine direkte Kalibration, die substanzunabhängig ist.

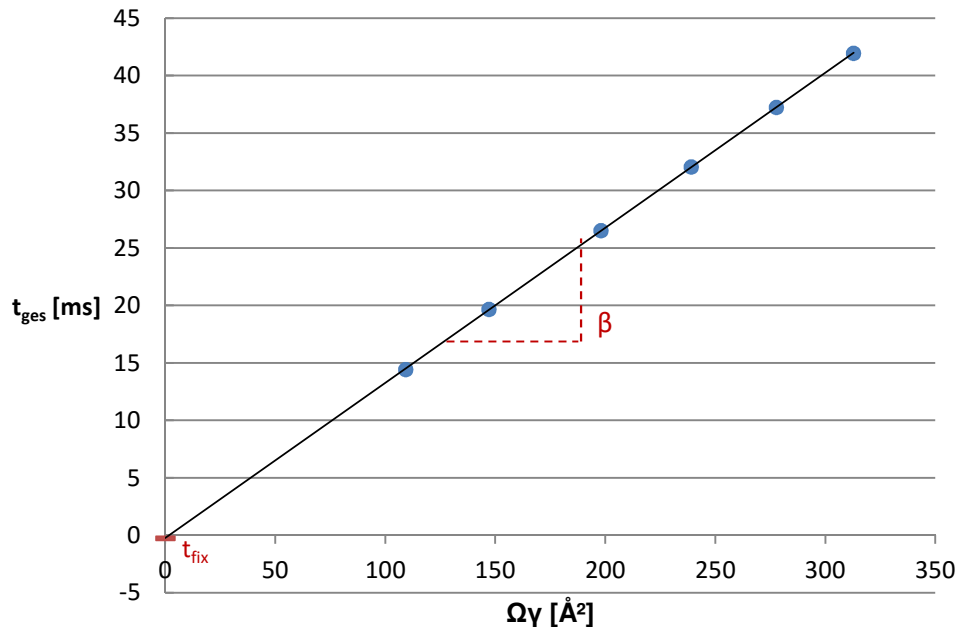


Abbildung 18: Kalibrationsgerade für CCS Messungen nach der Single-Field Methode. β wird aus der Steigung und t_{fix} aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden bestimmt.

5.1.1.3 Vergleichbarkeit von Stepped-Field und Single-Field Methode

Zum Vergleich der beiden Methoden werden in einem Diagramm für eine Auswahl an Standards die ermittelten CCS nach der Stepped-Field und der Single-Field Methode gegenübergestellt (Abbildung 19). Die dargestellten Werte für die Stepped-Field Methode wurden, wie in 5.1.1.1 beschrieben, bei acht verschiedenen Driftspannungen zwischen 1000 und 1700 V gemessen und hier mit der entsprechenden Standardabweichung aufgetragen. Die Single-Field Methode wurde für eine Messung bei einer Driftspannung von 1700 V, bei der laut Gerätehersteller die beste Auflösung erzielt wird, nach entsprechender Kalibration wie in 5.1.1.2 erläutert, durchgeführt. Abbildung 19 zeigt deutlich, dass die nach beiden Methoden erzielten Werte sehr gut vergleichbar sind. Die berechneten Abweichungen lagen bei maximal 0,4 % und liegen damit im Rahmen der nach 5.1.1.1 erreichbaren Präzision.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für weitere Messungen von Standards zum Aufbau der CCS Datenbank für eine höhere Sicherheit weiterhin die Stepped-Field Methode mit acht verschiedenen elektrischen Feldstärken eingesetzt, die bei Einzel-

standards oder einfachen Standardgemischen ohne chromatographische Trennung in nur acht Minuten je Probe durchgeführt werden kann. Für die Analyse von Realproben mit HPLC- und LC+LC-IM-qTOF-MS mit längerer Laufzeit wurde dagegen, da eine Vergleichbarkeit wie oben gezeigt gegeben ist, die Single-Field Methode mit 1700 V als Driftspannung angewendet.

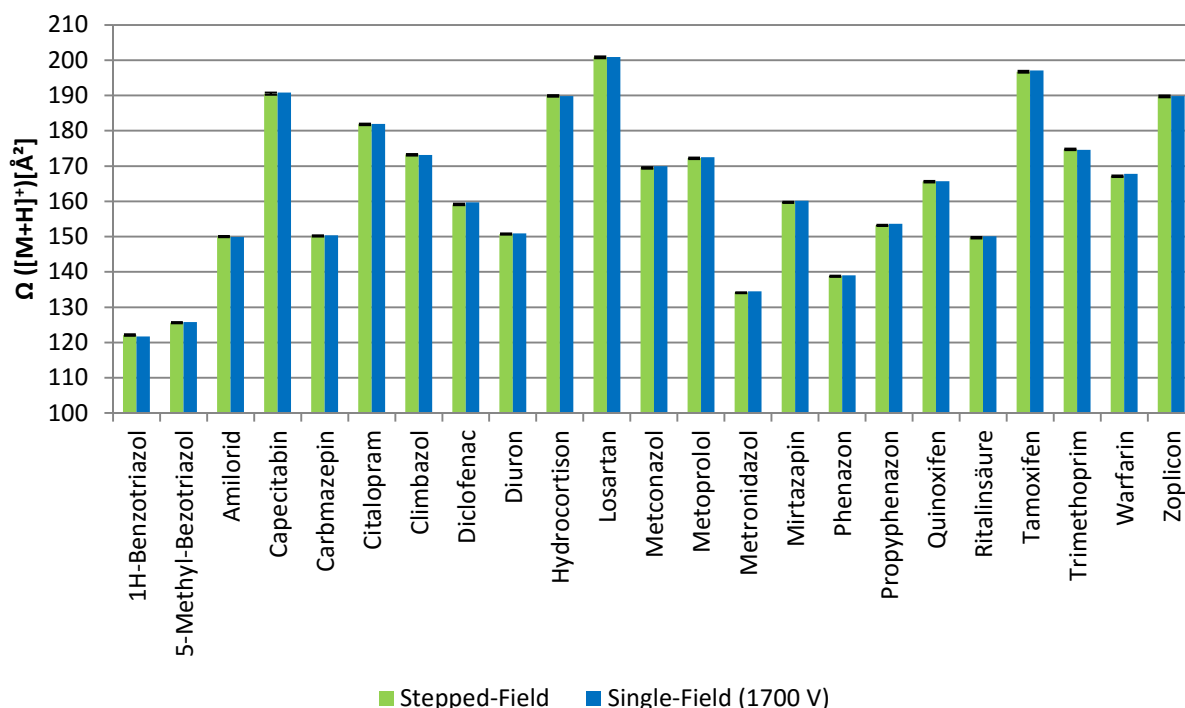


Abbildung 19: Vergleich von CCS ausgewählter Standards nach der Stepped-Field Methode (Mittelwert aus acht CCS-Werten mit Fehlerbalken) und der Single-Field Methode (Einfachbestimmung)

5.1.2 Trennung von Isobaren

5.1.2.1 Trennung kleiner isobarer Moleküle

Ein entscheidender Vorteil der Kopplung von Ionenmobilitätsspektrometrie und Massenspektrometrie (IM-MS) ist die Möglichkeit, isobare Substanzen mit gleicher Masse, die sich jedoch in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden, aufgrund ihres Größe-zu-Ladungs Verhältnisses trennen zu können. Je nach Größe der Ionen und Art der Strukturunterschiede ist dies jedoch nicht in allen Fällen möglich. Chirale Moleküle können, wenn überhaupt, erst durch den Zusatz von chiralen Gasen wie 2-Butanol zum Driftgas getrennt werden [42]. Inwieweit die Trennung von Isobaren mit dem in dieser Arbeit verwendeten System möglich ist, soll im Folgenden an einigen Beispielen gezeigt werden. Dabei wurde ausschließlich Stickstoff als Driftgas eingesetzt, da

die bisherige Ventilausstattung des Gerätes keine zuverlässige Analyse mit anderen Driftgasen zulässt [135]. Insgesamt 13 Paare und ein Triplett von isobaren Substanzen wurden einzeln gemessen und die CCS-Werte nach der Stepped-Field Methode bestimmt. Aus der im Driftspektrum enthaltenen Driftzeit t_D und der Peakbreite auf halber Höhe (FWHM) wurde außerdem für jedes Isobarenpaar die Auflösung R zwischen zwei Peaks analog zur Chromatographie berechnet [207]:

$$R = 1,18 \frac{(t_{D,1} - t_{D,2})}{FWHM_1 + FWHM_2}$$

Gleichung 29

CAUSON et al. nehmen an, dass ab einer Auflösung zwischen zwei Driftpeaks von $R = 0,6$ die IM Trennung in der Driftröhre ausreichend ist, um einzelne Peakmaxima zu erkennen und so zwei isobare Substanzen zu unterscheiden. Dazu wäre näherungsweise eine Differenz der CCS von mindestens 1,5 bis 1,8 % erforderlich (Werte basierend auf experimentellen CCS Daten) [207]. In Tabelle 12 sind für die untersuchten isobaren Substanzen sowohl die Auflösung nach Gleichung 29 als auch die absoluten und relativen Unterschiede zwischen den CCS dieser Substanzen zusammengefasst. Außerdem ist angegeben, ob es sich bei den Paaren mit gleicher Summenformel um Konstitutionsisomere (K), Diastereomere (D) oder Enantiomere (E) handelt. Einen Überblick über alle Summenformeln und Strukturformeln gibt Tabelle 22 im Anhang (S. 106). Die $[M+H]^+$ -Addukte der Substanzpaare Tramadol und Desvenlafaxin, Diethylstilbestrol und Equilin sowie Dihydrotestosteron und Etiocholanon können mit einer Auflösung von 0,6 oder größer getrennt werden. Die Unterschiede in den Collision Cross Section Werten liegen dabei zwischen 1,8 und 7,0 % (3,0 und 12,2 Å²). Bei den Natriumaddukten wird eine Auflösung von mindestens 0,6 bei den Paaren Diethylstilbestrol und Equilin sowie Glucose und Fructose erreicht, wobei Cyclophosphamid und Ifosfamid sowie Dihydrotestosteron und Etiocholanon mit $R = 0,5$ nur geringfügig darunter liegen. Diese vier Paare unterscheiden sich in ihren CCS um 1,7 bis 10,7 % (3,4 bis 20,5 Å²). Nach den Arbeiten von CAUSON et al. können also von den hier untersuchten Isobaren drei Paare anhand der CCS ihres $[M+H]^+$ -Addukts und vier über das $[M+Na]^+$ -Addukt in der IMS Dimension getrennt werden, wobei es sich immer um Konstitutionsisomere handelt. Die Trennung von Enantiomeren ist wie zu erwarten nur mit Stickstoff als Driftgas ohne Zusatz eines

chiralen Gases nicht möglich. Auch bei den hier untersuchten Diastereomerenpaaren kann keine ausreichende Trennung festgestellt werden, wobei die Natriumaddukte von Doxorubicin und Epirubicin mit einer Auflösung von $R = 0,4$ und einer CCS-Differenz von 1,0 % noch den größten Unterschied zeigen. CAMPUZANO et al. konnten zeigen, dass die Diastereomere Betamethason ($189,4 \text{ \AA}^2$) und Dexamethason ($190,4 \text{ \AA}^2$) sich in ihren CCS-Werten um 0,5 % unterscheiden (gemessen als $[M+H]^+$ -Addukte in N_2 , [134]), womit auch hier in einer Mischung von beiden Substanzen nicht zwei einzelne Peaks erkennbar wären. Eine gute Trennung von diastereomeren Zuckern erreichten DWIVEDI et al. unter anderem für das Paar Methyl- α -Galactopyranosid und Methyl- β -Galactopyranosid ($R = 1,03$ für die Natriumaddukte in N_2 , [37]). Auch bei einigen der hier betrachteten Konstitutionsisomere wie zum Beispiel 4-Methyl-Benzotriazol und 5-Methyl-Benzotriazol, die sich nur durch die Position einer Methylgruppe unterscheiden, scheinen die Strukturunterschiede nicht ausreichend genug für eine Auftrennung im IMS zu sein. Auffällig ist, dass je nach Adduktion einzelner Substanzen deutlichere oder weniger deutliche Unterschiede in den CCS beobachtet werden. So liegt die Abweichung der CCS von Cyclophosphamid und Ifosfamid beim $[M+H]^+$ -Addukt bei 0,3 % und damit im Bereich der Messungengenauigkeit des Systems nach Abschnitt 5.1.1.1. Die Natriumaddukte der beiden Substanzen unterscheiden sich dagegen in ihrer Collision Cross Section um 2,2 % und sind damit gut differenzierbar. Tramadol und Desvenlafaxin sind dagegen als $[M+H]^+$ -Ionen deutlich unterscheidbar, während für Tramadol kein $[M+Na]^+$ -Signal beobachtet werden konnte. Je nach Position im Molekül, an der sich ein Proton bzw. ein Natriumion anlagert kann es durch Abstoßung oder Faltung innerhalb des Moleküls zu einer anderen Ausdehnung der räumlichen Struktur kommen [208,209]. Das Triplett Dihydrotestosteron, Etiocholanon und Androsteron gliedert sich in zwei Gruppen: die Diastereomere Etiocholanon und Androsteron sind in ihrer Größe sehr ähnlich und weichen nur um 0,1 % (H-Addukt) bzw. 0,3 % (Na-Addukt) in ihrer CCS voneinander ab.

Tabelle 12: Unterscheidbarkeit ausgewählter Isobarenpaare (K: Konstitutionsisomere, D: Diastereomere, E: Enantiomere) im IMS mit N₂ als Driftgas; die Auflösung R zwischen zwei Driftpeaks wurde aus der Driftzeit t_D und der Peakbreite auf halber Höhe FWHM berechnet; die CCS mit Standardabweichung s wurde für jede Substanz einzeln bestimmt und die absolute sowie die relative Differenz zwischen zwei Isobaren ermittelt

Substanz		[M+H] ⁺ -Addukt						[M+Na] ⁺ -Addukt					
		t _D	FWHM	R	Ω	s	Δ Ω	t _D	FWHM	R	Ω	s	Δ Ω
		[ms]	[ms]		[Å²]		[%]	[ms]	[ms]		[Å²]		[%]
5-Methyl-Benzotriazol	K	15,24	0,38	0,1	125,9	0,14	0,5						
4-Methyl-Benzotriazol		15,21	0,38			125,3							
Cyclophosphamid	K	18,84	0,39	0,1	147,3	0,17	0,3	19,91	0,48	0,5	155,2	0,20	2,2
Ifosfamid		18,90	0,38			147,7		0,17	20,33		0,45		
Tramadol	K	20,36	0,61	1,0	161,1	0,18	3,5						
Desvenlafaxin		21,34	0,57			167,0							
Diethylstilbestrol	K	21,33	0,41	0,6	167,2	0,18	1,8	21,89	0,42	3,5	171,2	0,16	10,7
Equilin		20,91	0,42			164,2		0,22	24,47		0,46		
Estron	K	21,11	0,42	0,2	165,5	0,23	0,5	24,60	0,47	0,2	192,6	0,25	0,5
Trenbolon		21,22	0,45			166,3		0,23	24,75		0,49		
Dehydroepiandrosteron	K	21,85	0,90	0,4	169,1	0,28	2,3	25,42	0,53	0,2	197,2	0,27	0,2
Testosteron		22,33	0,54			173,0		0,20	25,59		0,57		
Dihydrotestosteron	K D	23,48	0,86	1,2	185,4	0,19	7,0	25,91	0,56	0,5	201,6	0,21	1,7
Etiocholanon		22,20	0,39		0,1	173,2		0,27	25,45		0,50	0	
Androsteron		22,26	0,45			173,3	0,23	0,1	25,45	0,55			197,7

Ergebnisse und Diskussion

Substanz		[M+H] ⁺ -Addukt						[M+Na] ⁺ -Addukt					
		t _D [ms]	FWHM [ms]	R	Ω [Å²]	s	Δ Ω [%]	t _D [ms]	FWHM [ms]	R	Ω [Å²]	s	Δ Ω [%]
Lactose	K							22,78	0,54	0,2	175,3	0,23	0,7
Saccharose								22,58	0,52		174,1	0,21	
Ofloxacin	E	25,32	0,63	0	195,1	0,26	0,1	25,88	0,73	0	199,3	0,24	0,2
Levofloxazin		25,31	0,56		195,0	0,25		25,89	0,73		199,0	0,25	
Doxorubicin	D							30,93	0,66	0,4	234,6	0,30	1,0
Epirubicin		29,72	1,00		225,7	0,22		30,54	0,56		232,2	0,23	
Iomeprol	K	30,15	0,60	0,4	226,8	0,36	0,9	28,76	0,56	0,1	216,4	0,28	1,0
Iopamidol		29,79	0,57		224,7	0,31		28,91	0,93		218,5	0,26	
Corticosteron	K	24,31	0,54	0,1	187,8	0,24	0,3	27,58	0,63	0,1	212,3	0,28	0,4
Cortexolon		24,42	0,55		188,3	0,25		27,48	0,64		211,4	0,27	
Cortison	K	24,54	0,54	0,4	190,1	0,25	2,0	27,75	0,55	0,2	214,3	0,30	1,1
Prednisolon		24,17	0,50		186,3	0,25		27,54	0,59		211,9	0,29	
Fructose	K							17,64	0,38	0,9	142,2	0,17	3,7
Glucose								18,29	0,46		147,7	0,17	

Dihydrotestosteron, dessen Struktur durch vertauschte Stellung der Hydroxy- und der Ketogruppe eine andere Konstitution hat, weist dagegen mit einem Unterschied, berechnet zu Etiocholanon, von 7,0 % beim $[M+H]^+$ -Addukt und 1,7 % beim Natriumaddukt einen deutlich größeren Stoßquerschnitt auf als die anderen beiden Substanzen. Die Monosaccharide Fructose und Glucose liegen als Furanose (5-Ring) bzw. Pyranose (6-Ring) vor (s. Strukturformeln in Abbildung 20 a). Die CCS der Natriumaddukte können mit einer Differenz von 3,7 % gut voneinander getrennt werden, wie auch das Driftspektrum einer Mischung dieser beiden Substanzen in Abbildung 20 a zeigt. Die Disaccharide Lactose und Saccharose enthalten je eine Pyranose (Glucose), die im Falle von Lactose mit einer weiteren Pyranose (Galactose) und bei Saccharose mit einer Furanose (Fructose) verknüpft ist. Dieser Unterschied scheint bei der Gesamtgröße des Moleküls weniger ins Gewicht zu fallen, sodass die Stoßquerschnitte der Natriumaddukte sich hier nur um 0,7 % unterscheiden. In Abbildung 20 b ist zu erkennen, dass bei einer Mischung von Lactose und Saccharose nur ein gemeinsamer Driftpeak im Driftspektrum erscheint.

5.1.2.2 Trennung isobarer Peptide

Des Weiteren sollte festgestellt werden, inwieweit Peptide, die aus gleichen Aminosäuren zusammengesetzt sind, sich aber teilweise in ihrer Sequenz unterscheiden, mit der Ionenmobilitätsspektrometrie getrennt werden können. Dazu wurden im Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften (ISAS – e.V.) sechs Peptide, bestehend aus jeweils 17 gleichen Aminosäuren ($M = 1500,85$ Da), wobei nur die Reihenfolge von 5 Aminosäuren in der Mitte variiert, synthetisiert. Eine Mischung dieser Peptide wurde nach der Stepped-Field Methode ohne chromatographische Vortrennung analysiert. Abbildung 21 zeigt einen Ausschnitt des Massenspektrums, das Signale bei

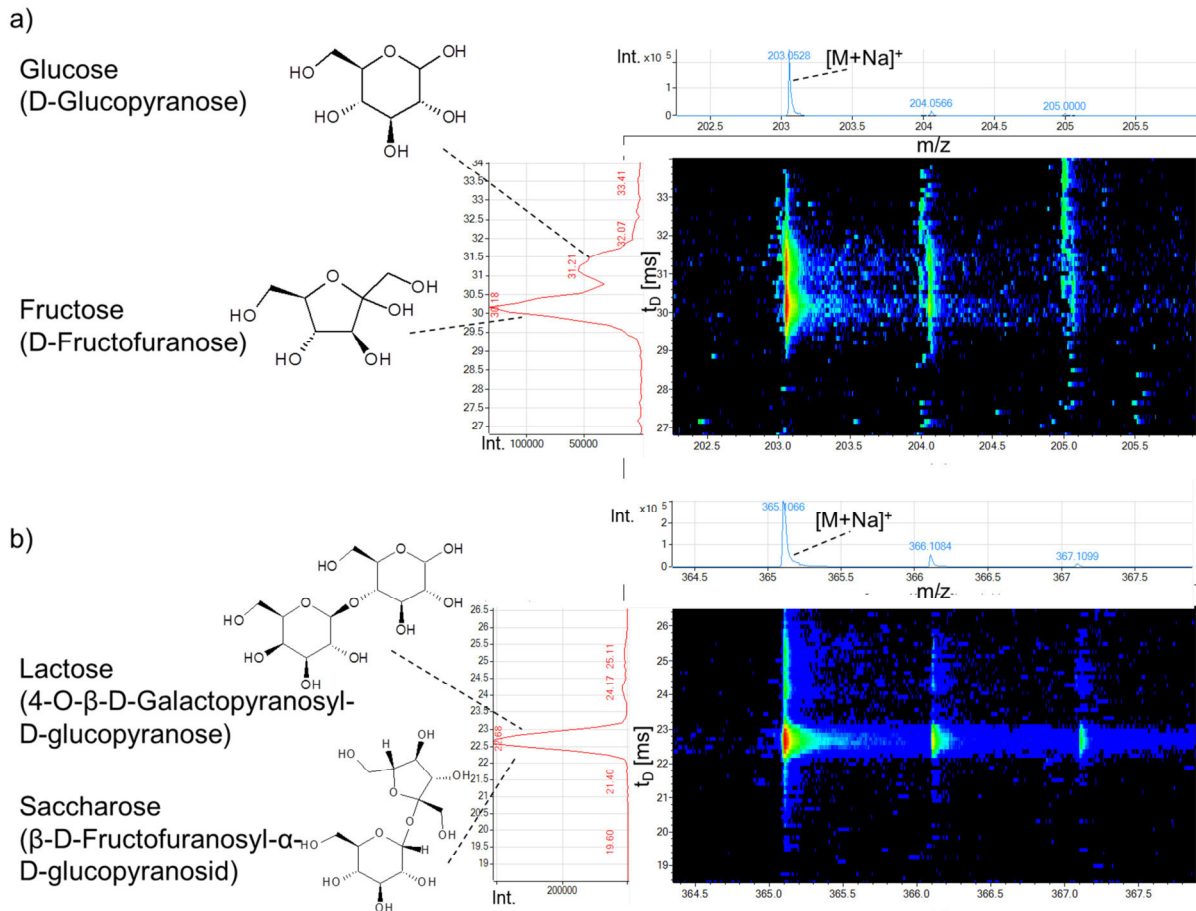


Abbildung 20: Strukturformeln von Glucose und Fructose (a) bzw. Lactose und Saccharose (b) sowie das Driftspektrum (rot), das Massenspektrum (blau) und ein 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) von einer Mischung der jeweiligen Substanzpaare bei $E = 18,1 \text{ V/cm}$

den m/z -Verhältnissen des $[M+H]^+$ - und des $[M+Na]^+$ -Addukts enthält. Im Driftspektrum und im 2D-Plot von m/z gegen die Driftzeit ist zu erkennen, dass die $[M+H]^+$ -Addukte der sechs Peptide insgesamt zwei deutlich abgegrenzte Peaks liefern. Die Peptide unterscheiden sich also in ihrer Faltung zumindest teilweise, sodass sie in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Als Natriumaddukte scheinen die Peptide dagegen eine deutlich kompaktere und dadurch einheitlichere räumliche Struktur einzunehmen, da hier für alle sechs Peptide nur ein gemeinsamer Driftpeak zu erkennen ist, der zudem eine geringere Driftzeit aufweist als die Peaks der $[M+H]^+$ -Addukte. Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in den CCS der Peptide wider, die nach der Stepped-Field Methode für jedes Peptid einzeln bestimmt wurden (Tabelle 13). Die $[M+H]^+$ -Addukte der Peptide 1 bis 3 haben CCS-Werte zwischen

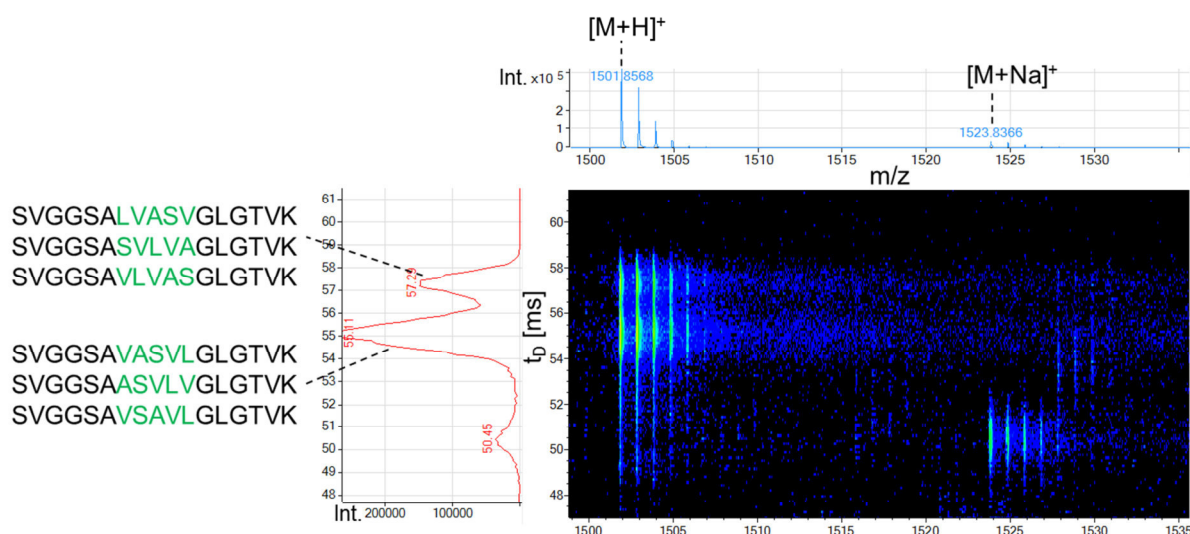


Abbildung 21: Driftspectrum (rot), Massenspektrum (blau) und ein 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) von einer Mischung aus sechs Peptiden mit gleicher Aminosäurezusammensetzung, aber teilweise anderer Reihenfolge der Verknüpfung bei $E = 18,1 \text{ V/cm}$

400,6 und 405,0 Å². Die Differenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden CCS liegt dabei bei maximal 0,6 % (Peptid 2 und 3), womit sie nach [207] nicht eindeutig unterschieden werden können. Die Peptide 4 bis 6 haben als $[M+H]^+$ -Addukte CCS zwischen 418,3 und 419,5 Å² mit einer maximalen Abweichung von bis zu 0,3 % zwischen Peptid 4 und 5 und liegen somit noch näher aneinander. Das größte Peptid der kleineren Gruppe (Peptid 3) und das kleinste Peptid der größeren Gruppe (Peptid 4) unterscheiden sich dagegen um 3,3 % und können damit im IMS gut voneinander getrennt werden. Die CCS der Natriumaddukte sind mit 368,3 bis 370,9 Å² dagegen deutlich kleiner und liegen außerdem bei allen Peptiden (bei Peptid 5 war eine Bestimmung aufgrund zu geringer Signalintensität nicht möglich) relativ nah beieinander. Die Abweichung vom größten (Peptid 6) zum kleinsten Wert (Peptid 1) beträgt hier nur 0,7 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit dem in dieser Arbeit verwendeten IM-qTOF-MS System teilweise möglich ist, isobare Substanzen mit gleicher Summenformel und gleicher Masse aufgrund ihres Größe-zu-Ladungs Verhältnisses in der Ionenmobilitätsspektrometrie zu trennen. Dazu müssen die Substanzen sich zumindest in ihrer Konstitution unterscheiden, wobei auch dann nicht immer eine ausreichende Trennung mit einem CCS Unterschied von mindestens 1,5 % möglich ist.

Tabelle 13: CCS von sechs isobaren Peptiden mit gleicher Aminosäurezusammensetzung. Für die [M+H]⁺-Addukte ist jeweils der relative Unterschied zwischen zwei von der Größe her aufeinanderfolgenden Peptiden angegeben.

Peptid Nr.	Peptidsequenz	[M+H] ⁺ -Addukt			[M+Na] ⁺ -Addukt	
		Ω [Å ²]	s [Å ²]	ΔΩ [%]	Ω [Å ²]	s [Å ²]
1	SVGGSA VAS VLGLGTVK	400,6	0,8		368,3	0,8
2	SVGGSA VS AVLGLGTVK	402,6	0,9	0,5	368,4	1,0
3	SVGGSA AS VLVGLGTVK	405,0	1,0	0,6	369,3	0,9
4	SVGGSA S VLVAGLGTVK	418,3	1,1	3,3	368,8	0,9
5	SVGGSA L VASVGLGTVK	419,5	1,3	0,3	n.b.	n.b.
6	SVGGSA V LVASGLGTVK	419,8	1,1	0,1	370,9	1,1

Die räumliche Ausdehnung der Ionen ist zudem je nach gebildetem Addukt unterschiedlich, sodass die Trennung von Isobaren je nach betrachtetem Ion besser oder schlechter sein kann. Eine Verbesserung der Trennung könnte bei einigen Analyten durch Variation des Driftgases erreicht werden. Arbeiten von KURULUGAMA et al. [135] zeigen jedoch, dass der Einsatz von polarisierbaren Gasen wie CO₂ oder N₂O nicht unbedingt zu einer besseren Trennung von chemisch ähnlich Ionen führen, da eine starke Wechselwirkung zwischen Gasmolekülen und Analytionen die allein durch strukturelle Unterschiede erzielte Trennung eher wieder reduziert. Eine Trennung von Enantiomeren und Diastereomeren könnte durch den Einsatz von chiralen Gasen wie 2-Butanol erreicht werden. Für die Verwendung eines anderen Driftgases als Stickstoff ist jedoch eine apparative Erweiterung (Gas-Kit) [201] erforderlich, die bei den hier durchgeführten Arbeiten nicht zur Verfügung stand.

5.1.3 Erstellung und Anwendung einer Datenbank

Im Verlauf dieser Arbeit wurden über 500 Substanzen unterschiedlicher Klassen wie in 5.1.1.1 beschrieben analysiert. Die ermittelten CCS-Werte sollten in einer Datenbank zusammengefasst werden, die später die Identifizierung von Komponenten in Realproben über deren exakte Masse und die CCS erlaubt. Der Aufbau und die Funktionen dieser Datenbank wurden in der vorliegenden Arbeit entwickelt und in einer von J. Hippler programmierten Software (CCS – Database by AAC) umgesetzt. Diese wird im Folgenden beschrieben.

Die Datenbank enthält für jede analysierte Substanz Informationen zu IUPAC-Namen, Trivialnamen, Summenformel, CAS-Nummer, exakter Masse sowie die CCS-Werte aller möglichen Ionen inklusive Standardabweichung, die im positiven und im negativen ESI Modus bestimmt werden konnten. Dabei werden folgende Addukte in Betracht gezogen: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ und $[M+2H]^{2+}$ im ESI-positiv Modus sowie $[M]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ und $[M+HCOO]^-$ im ESI-negativ Modus. Das entsprechende m/z-Verhältnis der einzelnen Adduktionen wird aus der exakten Masse direkt in der Software berechnet und ebenfalls hinterlegt. Nach einzelnen Einträgen kann in der Datenbank über das m/z-Verhältnis, die CAS-Nummer oder den Namen gesucht werden. Für die Suche nach einzelnen, unbekannten Substanzen kann die Software nach dem m/z-Verhältnis und der CCS eines beobachteten Ions durchsucht werden. Als Ergebnis werden nur Einträge der Datenbank ausgegeben, bei denen sowohl m/z als auch CCS in einem wählbaren Toleranzbereich ($\pm \Delta m/z$ [ppm] und $\pm \Delta \Omega$ [%]) mit den gesuchten Werten übereinstimmen. Um die Datenbank nach mehreren Komponenten gleichzeitig zu durchsuchen kann eine Liste im *.csv-Format, die unter anderem Werte für m/z und CCS enthält, in die Software importiert werden. Diese Liste kann zum Beispiel bei der Non-Target Analyse komplexer Proben durch Extrahieren sogenannter Features (4D-Feature extraction mit der Software IM-MS Browser B.07.01 von Agilent Technologies) erstellt werden. Die Datenbank wird für alle Einträge der Liste nach der Kombination aus m/z und CCS in einem definierten Toleranzbereich durchsucht. Die Ergebnisse dieser Suche werden in einer Tabelle, wie in Abbildung 22 gezeigt, als „identified features“ mit der jeweiligen Abweichung zum Datenbankeintrag angezeigt. Diese Tabelle kann zur weiteren Bearbeitung wieder als *.csv-Datei exportiert werden.

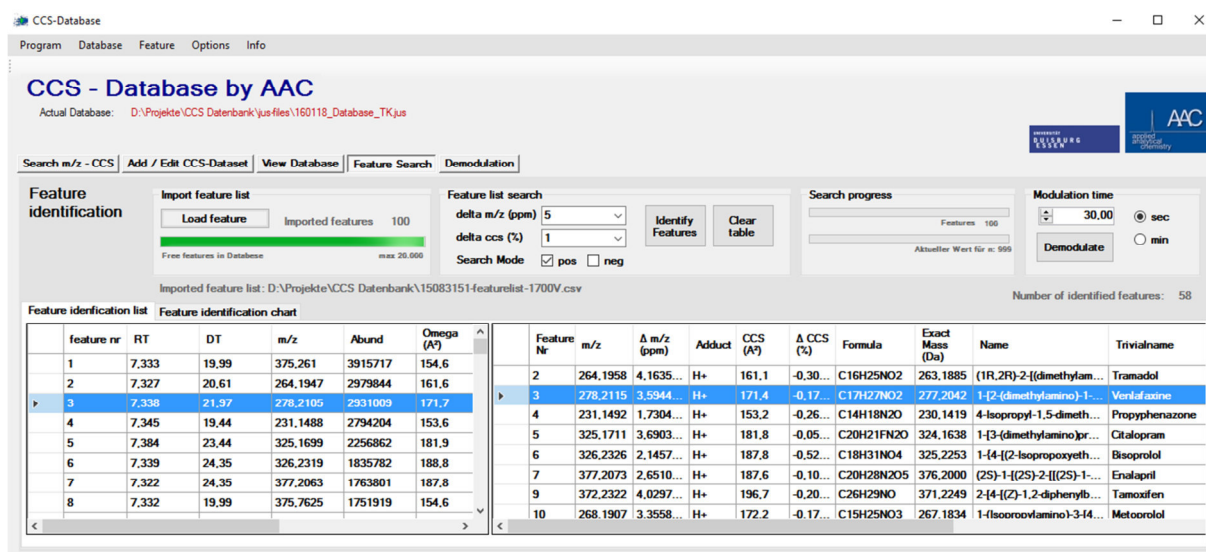


Abbildung 22: Ansicht der CCS - Datenbanksoftware mit importierter Feature Liste („feature identification list“; links) und Ergebnissen der Datenbanksuche („identified features“; rechts) bei einer Toleranz von $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %

5.2 Analyse von Realproben mit HPLC-(IM)-qTOF-MS

Die Kopplung von eindimensionaler HPLC mit Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie ermöglicht eine Auftrennung komplexer Proben in drei Dimensionen. Im Folgenden soll das Potential einer solchen Trennung anhand verschiedener Realproben gezeigt werden.

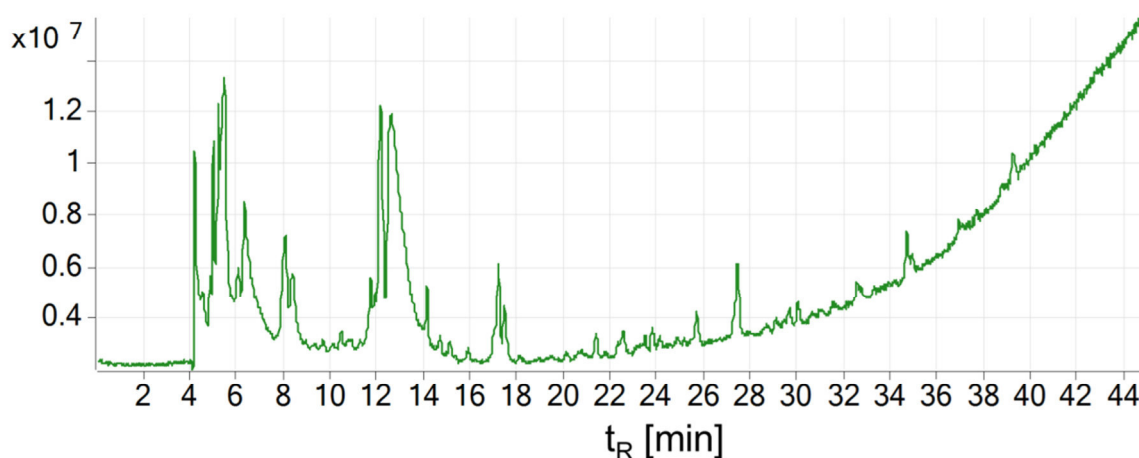
5.2.1 Analyse von Fruchtsäften mit HPLC-IM-qTOF-MS

Fruchtsaft ist gemäß [210] das gärfähige, jedoch nicht gegorene, aus dem genießbaren Teil gesunder und reifer Früchte gewonnene Erzeugnis, das die für den Saft dieser Frucht charakteristische Farbe, das dafür charakteristische Aroma und den dafür charakteristischen Geschmack aufweist. Die durch mechanische Verfahren gewonnenen Säfte werden entweder als Direktsäfte frisch abgefüllt und in den Handel gebracht oder am Herstellungsort für den Transport aufkonzentriert und anschließend mit Wasser rückverdünnt (Rekonstitution). Fruchtsäfte aus Konzentrat müssen gleichartige Farbe und Aussehen sowie Geruch und Geschmack aufweisen wie direkt gepresste Fruchtsäfte [211]. Hauptinhaltsstoffe von Fruchtsäften sind Zucker und organische Säuren sowie freie Aminosäuren, Carotinoide und Mineralien. Charakteristisch für viele Fruchtsäfte ist zudem das Vorkommen phenolischer Verbindungen wie Flavonoide, die meist glykosidisch gebunden vorliegen [212].

5.2.1.1 HPLC-IM-qTOF-MS Analyse am Beispiel von Zitronensaft

Am Beispiel einer Zitronensaftprobe sollen in diesem Abschnitt einige Merkmale der HPLC-IM-qTOF-MS Analyse beschrieben werden. Abbildung 23 a zeigt das einfache Totalionenchromatogramms (TIC) der Analyse von Zitronensaft mit HPLC-IM-qTOF. In Abbildung 23 b ist von dem gleichen Analysenlauf eine sogenannte Heatmap dargestellt, in der die im IMS gemessene Driftzeit gegen die Retentionszeit der chromatographischen Trennung aufgetragen ist.

a)



b)

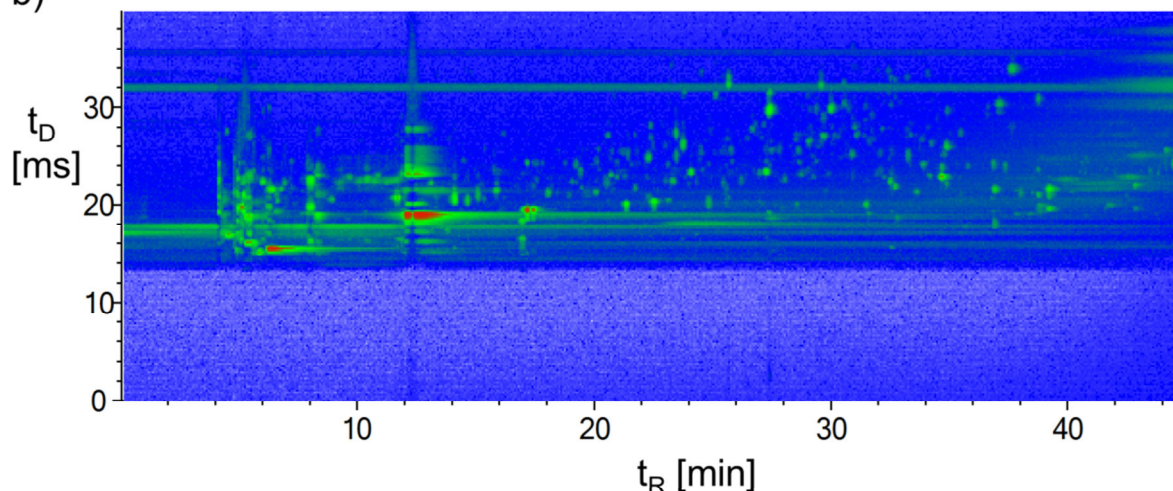


Abbildung 23: a) Totalionenchromatogramm (TIC, ESI pos.) einer HPLC-IM-qTOF-MS Analyse von Zitronensaft und b) entsprechende Heatmap aus Driftzeit t_D gegen Retentionszeit t_R ; Methodenparameter in Tabelle 3

Es wird deutlich, dass die Driftzeit bereits auf den ersten Blick zusätzliche Informationen über die Beschaffenheit der Probe bietet. Neben der Trennung auf der

HPLC-Säule werden die Komponenten der Probe hier auch nach ihrem Stoßquerschnitt in der IMS-Driftröhre getrennt und verlassen diese mit Driftzeiten zwischen etwa 14 und 32 ms. Dabei ist zu erkennen, dass häufig mehrere Substanzen chromatographisch coeluieren, sodass sie im TIC in Abbildung 23 a in einem Peak übereinander liegen, in der Driftzeitachse aber aufgetrennt werden und so in Abbildung 23 b als einzelne Spots erscheinen. Des Weiteren zeigt das Chromatogramm durch den Gradienten einen deutlichen Anstieg der Basislinie, sodass kleinere Peaks im TIC nicht mehr deutlich zu erkennen sind. In der Heatmap sind Hintergrundsignale sowie auch gezielt eingesetzte Referenzsubstanzen, die während des gesamten Laufs ebenfalls gemessen werden, als durchgängige Streifen zu sehen. Die Analyten können aufgrund ihrer Driftzeit davon unterschieden werden und sind durch die zweidimensionale Darstellung als einzelne Spots davon abgesetzt dargestellt. Es sollte aber berücksichtigt werden, dass Signale mit verschiedenen Driftzeiten bei der gleichen Retentionszeit auch auf unterschiedliche Adduktionen bzw. durch Fragmentierung in der Ionenquelle entstandene Bruchstücke von ein und derselben Substanz zurückgeführt werden können. Als dritte Dimension in dieser Methode bietet die Flugzeit-Massenspektrometrie Informationen über die exakte Masse der Komponenten. So kann bei herkömmlichen HPLC-MS Kopplungen zu jeder Retentionszeit ein komplettes Massenspektrum extrahiert werden. Bei HPLC-IM-MS ergibt sich zu jeder Retentionszeit ein Driftspektrum und ein Massenspektrum, die als zweidimensionaler Plot dargestellt werden können wie bereits in 5.1.2.1 und 5.1.2.2 gezeigt. Die beiden folgenden Beispiele sollen den Vorteil von LC-IM-MS gegenüber LC-MS verdeutlichen. Abbildung 24 zeigt den Auszug von Driftspektrum und Massenspektrum der Zitronensaftprobe bei einer Retentionszeit von 29,9 bis 30,2 Minuten. Das Massenspektrum weist ein Signal mit $m/z = 611,1987$ und zwei dazugehörige Isotopenpeaks auf. Im Driftspektrum sind dagegen zwei getrennte Peaks zu sehen. Im 2D-Plot resultieren daraus zwei Spots, die mit gleichem m/z -Verhältnis, aber unterschiedlicher Driftzeit erscheinen. Über die exakte Masse kann dieses Signal den $[M+H]^+$ -Addukten der isobaren Substanzen Hesperidin und Neohesperidin zugeordnet werden, die in Zitronensaft natürlicherweise vorkommen [213,214]. Beide Substanzen bestehen aus dem Flavonoid Hesperitin, das glykosidisch an ein Disaccharid gebunden vorliegt. Der einzige strukturelle Unterschied ist dabei die Position der Bindung

der beiden Monosaccharideinheiten, die im Fall von Hesperidin 1→6 verknüpft und bei Neohesperidin 1→2 verknüpft sind (s. Abbildung 24 b und c).

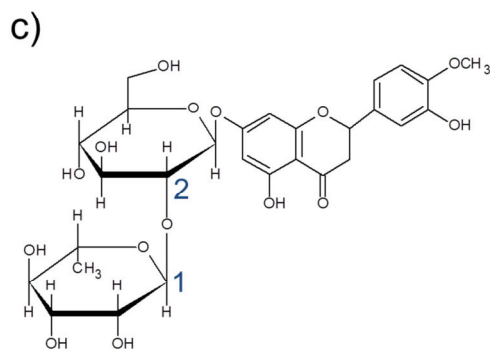
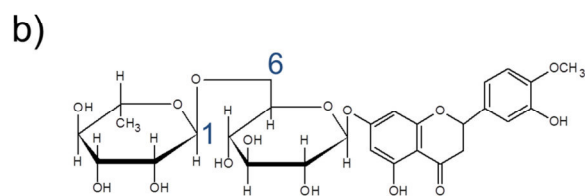
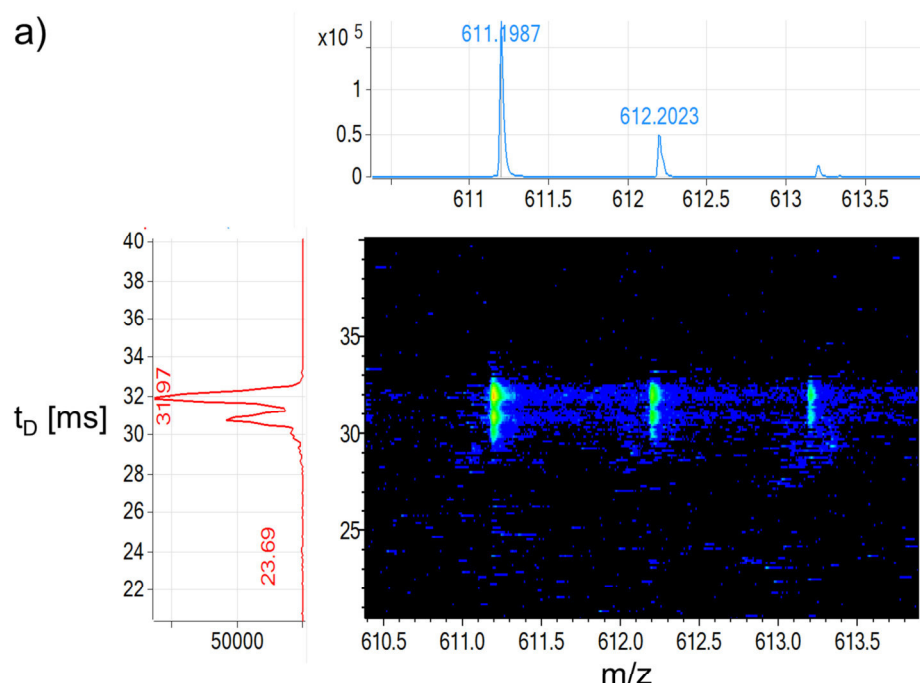


Abbildung 24:a) Driftspektrum (rot), Massenspektrum (blau) und 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) extrahiert bei $t_R=29,9-30,2$ min b) Strukturformel von Hesperidin c) Strukturformel von Neohesperidin

Die CCS der beiden Komponenten unterscheiden sich dadurch genug, um eine Trennung im IMS zu erreichen. Allein mit hochauflösender Massenspektrometrie würde sich nur ein Signal für beide Analyten zusammen ergeben. Um die beiden Driftpeaks von Hesperidin und Neohesperidin genau zuzuordnen, könnte die Probe mit einzelnen Standards dotiert werden, die jedoch in dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen. Daher war auch in der CCS Datenbank bisher kein Wert für diese Komponenten vorhanden, worüber ebenfalls eine eindeutige Zuordnung möglich wä-

re. Es wäre deshalb hilfreich, ein Verfahren zur sicheren Berechnung von CCS aus bekannten Strukturinformationen nutzen zu können, um wie im hier gezeigten Fall über berechnete CCS zwischen zwei möglichen Strukturen zu unterscheiden. Diese Berechnung ist bisher aber mit frei verfügbarer Software nicht trivial und ohne weitere Modifizierung nur für Helium als Driftgas möglich [134,215].

Als weiteres in Zitronensaft bekanntes Flavonoid soll hier auf Rutin [216,217] eingegangen werden. Das extrahierte Ionenchromatogramm (EIC) für das $[M+H]^+$ -Addukt von Rutin ($m/z = 611,1607$) ist in Abbildung 25 dargestellt. Dieses Chromatogramm enthält zwei Peaks mit dem m/z -Verhältnis von Rutin bei $t_R = 23,9$ und $t_R = 30,7$ Minuten. Um festzustellen, bei welchem der beiden Peaks es sich tatsächlich um Rutin handelt, könnte ein Rutinstandard zu der Probe dotiert oder MS/MS-Experimente durchgeführt werden. Bei strukturell sehr ähnlichen Substanzen reicht ein Fragmentspektrum aber gegebenenfalls nicht zur vollständigen Aufklärung aus und Standards sind nicht immer für sämtliche Substanzen verfügbar und häufig teuer. Die Information über die CCS, die aus der Messung mit IMS gewonnen werden kann, stellt daher bei Vorhandensein einer geeigneten Datenbank eine sinnvolle Alternative dar.

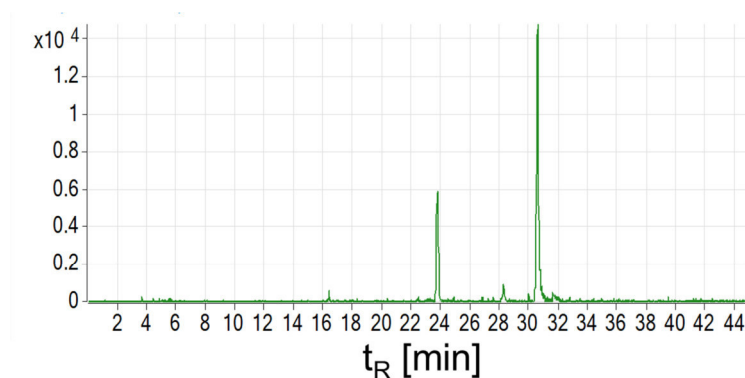


Abbildung 25: Extrahiertes Ionenchromatogramm des $[M+H]^+$ -Addukts von Rutin ($m/z = 611,1607$) der HPLC-IM-qTOF-MS Analyse von Zitronensaft (Bedingungen wie in Abbildung 23)

Im dargestellten Fall wurde mittels der Software IM-MS Browser eine Feature-Suche für die Analyse des Zitronensaftes durchgeführt. Dabei werden die Messdaten durch einen geeigneten Algorithmus nach Peaks durchsucht, die jeweils durch ihre Retentionszeit, Driftzeit, m/z -Verhältnis und Intensität charakterisiert sind. Die gefundenen Einträge werden als Feature bezeichnet. Für jedes Feature wird zusätzlich aus

der Driftzeit die CCS nach der Single-Field Methode, wie in 5.1.1.2 erläutert, berechnet. Ein Abgleich dieser Feature-Liste mit der in 5.1.3 genannten Datenbank führt zur Identifizierung von 11 Substanzen bei einer Toleranz von $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ % (s. Tabelle 14). Dabei wird der Peak bei 30,7 Minuten sowohl über das $[M+H]^+$ - als auch über das $[M+Na]^+$ -Addukt als Rutin erkannt. Bei dem Signal bei 23,9 Minuten in Abbildung 25 kann es sich um eine isobare Substanz mit der gleichen Summenformel wie Rutin handeln, die in der entwickelten Datenbank bisher nicht enthalten ist. Des Weiteren wurden einige Aminosäuren, Ascorbinsäure (Vitamin C) und die Zucker Fructose, Glucose und Saccharose gefunden, deren Vorkommen in Zitronen auch in der Literatur genannt wird (s. rechte Spalte in Tabelle 14). Aconitsäure ist ein Zwischenprodukt im Citratzyklus bei der Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat [218]. Da eine Unterscheidung von Saccharose und Lactose mit der vorliegenden Methode nicht möglich ist (s. 5.1.2.1), ergibt sich hier auch Lactose als Treffer, die als Zucker nur in Milchprodukten vorkommt und in Fruchtsaft nicht zu erwarten ist.

Tabelle 14: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der HPLC-IM-qTOF-MS Analyse von Zitronensaft mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å²]	$\Delta \Omega$ [%]	Substanz	Lit
4,53	174,1117	-0,6	H ⁺	137,2	0,7	L-(+)-Arginin	[217,219]
4,99	180,0634	0,5	Na ⁺	147,7	-0,9	D-(+)-Glucose	[217,219]
5,05	133,0375	0,0	H ⁺	131,6	0,9	L-(+)-Aspartat	[217]
5,44	180,0634	-1,0	Na ⁺	142,3	0,4	D-(-)-Fructose	[217,219]
6,08	342,1162	0,0	Na ⁺	173,9	0,2	Lactose	
6,08	342,1162	0,0	Na ⁺	174,1	0,3	Saccharose	[217,219]
7,98	176,0321	-2,5	Na ⁺	142,7	0,3	Ascorbinsäure	[219]
8,75	149,0510	0,0	H ⁺	133,5	0,3	L-(-)-Methionin	[219]
11,86	131,0946	0,8	H ⁺	134,4	0,7	L-(+)-Isoleucin	[219]
16,72	174,0164	-1,5	Na ⁺	145,8	0,6	Aconitsäure	
30,66	610,1534	1,0	H ⁺	234,4	0,7	Rutin	[217]
	610,1534	0,5	Na ⁺	249,4	0,9	Rutin	[217]

Das vorliegende Beispiel zeigt also neben einer erhöhten Trennleistung der HPLC-IM-MS auch die Möglichkeit der Trennung von isobaren Substanzen und den Beitrag der mit dieser Methode ermittelten CCS-Werte zur Identifizierung von Komponenten einer Probe.

5.2.1.2 Anwendung der Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (*engl. principal component analysis*, PCA) ist ein chemometrisches Verfahren, das immer häufiger zum Vergleich von Proben verschiedener Gruppen, unter anderem in Metabolomics-Studien und lebensmittelchemischen Fragestellungen, in Verbindung mit LC-MS eingesetzt wird [220–222]. Das Ziel der PCA ist es generell, eine große Zahl an Variablen (Messgrößen) zu wenigen Hauptkomponenten (*engl. principal components*, PC) zusammenzufassen und so die Menge der Daten zu reduzieren. Durch eine Achsentransformation werden dabei Hauptkomponenten bestimmt, die ein neues Koordinatensystem darstellen. Für jedes Objekt werden dann in diesem Koordinatensystem neue Koordinaten als *Scores* berechnet. Die *Loadings* geben für jede Hauptkomponentenachse an, wie groß der Beitrag der ursprünglichen Variablen dazu ist. Hohe Werte für die *Loadings* bedeuten einen großen Einfluss auf eine Hauptkomponente [223,224]. Bei non-target Analysen mit LC-MS können mittels geeigneter Software Feature gesucht werden, die bei einer bestimmten Retentionszeit mit einem bestimmten m/z-Verhältnis erscheinen und sich von Probe zu Probe in ihrer Intensität unterscheiden. Genauso können die Komponenten einer Probe nach der LC-IM-MS Analyse als Feature aufgelistet werden, die dann zusätzlich über die Driftzeit charakterisiert sind. Bei komplexen Proben können mehrere Hundert solcher Feature gefunden werden, sodass ein Vergleich zwischen zwei Gruppen von Proben nur schwer möglich ist. Jede Probe ist hierbei ein Objekt, das durch eine große Anzahl an Variablen, in diesem Fall die Intensitäten aller Feature, beschrieben wird. Durch die PCA werden die vielen Variablen reduziert auf einen *Score* in jeder der drei bis vier Hauptkomponenten. Anhand eines Plots dieser *Scores* können Gruppierungen der Proben leicht beobachtet werden. Wie stark die einzelnen Hauptkomponentenachsen durch jedes Feature beeinflusst werden, kann über die *Loadings* abgelesen werden.

In dieser Arbeit wurden insgesamt neun verschiedene Orangensäfte, davon vier Direktsäfte und fünf aus Konzentrat hergestellte Säfte, untersucht. Jede Probe wurde

dreimal mit HPLC-IM-MS analysiert. Die Heatmap der Analyse einer Direktsaftprobe ist exemplarisch im Anhang abgebildet (Abbildung 38, S. 112). Anschließend wurde für alle Proben eine Feature-Liste erstellt und eine PCA durchgeführt. Die *Scores* jeder Probe auf den ersten beiden Hauptkomponenten sind in Abbildung 26 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Säfte aus Konzentrat (blau) auf der ersten Hauptkomponente deutlich von den Direktsäften (rot) unterscheiden.

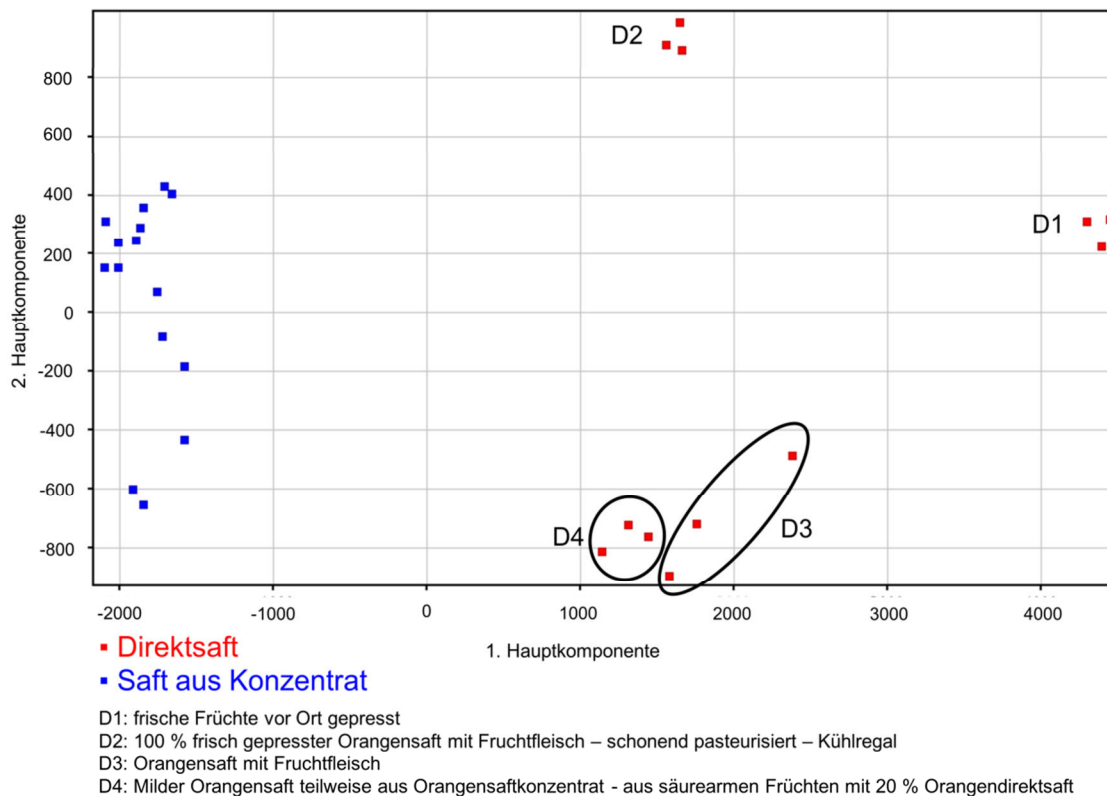


Abbildung 26: Scores-Plot der Hauptkomponentenanalyse von Orangensäften

Dabei sind die Säfte aus Konzentrat mit negativen *Scores* auf der ersten Hauptkomponente auch untereinander sehr ähnlich. In Richtung der zweiten Hauptkomponente zeigen einige der Proben leichte Unterschiede. Die vier untersuchten Direktsäfte haben auf der ersten Hauptkomponente positive *Scores*, wobei die Probe D1 in dem Plot noch deutlich weiter rechts liegt als die anderen drei. Zusätzlich findet hier eine deutliche Auftrennung auf der zweiten Hauptkomponente statt. Aufgrund des Herstellungsprozesses ist es denkbar, dass die Orangensäfte, die aus Konzentrat gezielt rückverdünnt werden, eher von vergleichbarer Qualität sind und sich auch von Sorte zu Sorte weniger stark unterscheiden. Größere Unterschiede innerhalb der Gruppe

der Direktsäfte könnten damit erklärt werden, dass diese nach der Gewinnung aus frischen Früchten direkt abgefüllt und spezifische Inhaltsstoffe wie z.B. flüchtige Aromastoffe weniger beeinflusst werden. Am deutlichsten ist nach der Hauptkomponentenanalyse der Saft D1 von den anderen abgegrenzt. Dabei handelt es sich um einen Saft, der vor Ort unmittelbar vor der Analyse aus frischen Orangen ausgepresst wurde und somit keinerlei Behandlung oder Lagerung erfahren hat. Probe D2 war im Gegensatz zu D3 und D4 mit einem Kühlhinweis versehen, was auf eine schonendere Behandlung hinsichtlich der Haltbarmachung hindeutet. Bei Probe D4 handelt es sich um eine Mischung aus Orangensaft aus Konzentrat und Orangendirektsaft. Offensichtlich ist der Anteil der für Direktsaft typischen Komponenten hoch genug, um diese Mischung nach der PCA der Gruppe der Direktsäfte zuzuordnen. Um festzustellen, welche Komponenten die im *Scores-Plot* (Abbildung 26) erkennbaren Gruppenunterschiede ausmachen, kann der *Loadings-Plot* betrachtet werden (Abbildung 27). Hier stellt jeder Punkt ein Feature der oben genannten Liste dar. Nach der oben erklärten Bedeutung der *Loadings* beeinflussen Features, die rechts liegen, die erste Hauptkomponente in positive Richtung. Features links im Plot sorgen für negative *Scores* auf dieser Hauptachse. Je weiter der *Loadings*-Wert dabei von Null entfernt ist, desto stärker ist der Einfluss. In Abbildung 27 sind einige Feature mit extremen *Loadings* markiert.

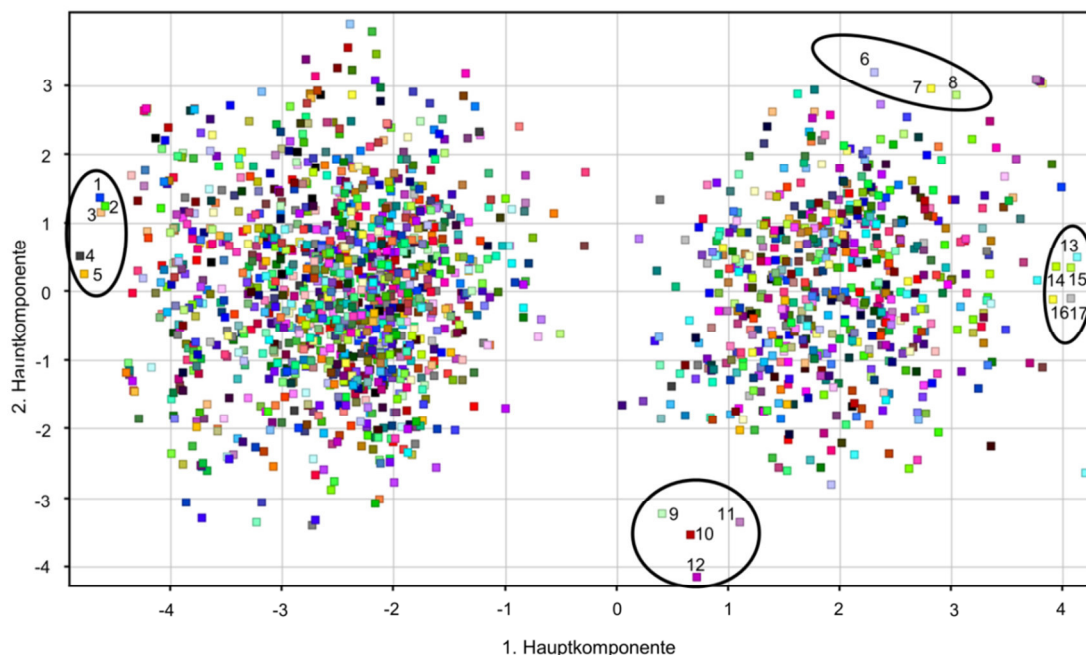


Abbildung 27: *Loadings-Plot* der Hauptkomponentenanalyse von Orangensäften

So sind die Komponenten mit den Nummern 1 bis 5 charakteristisch für die Orangensäfte aus Konzentrat. Die Features 6 bis 8 sind am stärksten in Saft D2 vertreten. Die Proben D3 und D4 werden am meisten durch Nummer 9 bis 12 charakterisiert. Bei Probe D1 haben die als Feature 13 bis 17 markierten Komponenten den größten Einfluss. Die so als am relevantesten für die Unterscheidung der Säfte befundenen Komponenten sind in Tabelle 15 aufgelistet. Jedes Feature ist dabei mit Retentionszeit (HPLC), Driftzeit und entsprechend berechneter CCS (IM) und m/z (TOF-MS) angegeben. Zusätzlich sind die *Loadings* auf den ersten beiden Hauptkomponenten entsprechend Abbildung 27 aufgeführt.

Tabelle 15: Charakteristische Feature der Hauptkomponentenanalyse von Orangensäften

Nr. in Abbil- dung 27	t_R [min]	m/z	t_D [ms]	Ω [Å²]	Loading PC 1	Loading PC 2
1	19,04	303,1052	21,09	166,2	-4,6	1,4
2	19,03	373,1086	25,05	195,5	-4,6	1,3
3	25,61	272,1153	22,59	178,8	-4,6	1,2
4	27,05	297,0582	22,36	176,2	-4,8	0,5
5	23,65	343,1174	24,16	189,2	-4,8	0,3
6	11,08	123,0553	19,09	159,7	2,3	3,2
7	6,53	145,0498	22,42	184,5	2,8	3,0
8	17,00	245,0097	21,56	171,6	3,0	2,9
9	5,14	219,0267	29,25	233,5	0,4	-3,2
10	34,80	499,2139	28,81	222,6	0,7	-3,5
11	11,80	311,0370	27,21	213,7	1,1	-3,3
12	20,06	380,1815	23,80	185,7	0,7	-4,1
13	34,78	209,0989	17,63	141,9	4,1	0,5
14	40,20	399,3077	26,10	203,1	3,9	0,4
15	4,94	130,0497	15,28	127,6	4,1	0,3
16	7,37	409,1124	23,50	183,0	3,9	-0,1
17	6,07	198,0973	22,47	180,9	4,1	-0,1

Anhand dieser Daten wäre nun eine Identifizierung der für die verschiedenen Säfte charakteristischen Substanzen möglich. Allerdings führte die Suche über m/z und CCS in der Datenbank (analog zu Tabelle 14 für Zitronensaft) zu keinem Treffer. Es ist anzunehmen, dass es sich um speziellere Inhaltsstoffe handelt, die in der Datenbank bisher nicht enthalten sind. Über die exakten Massen ist es zumindest möglich, wahrscheinliche Summenformeln der hier interessanten Substanzen zu ermitteln. Allerdings ergeben sich dabei allein für das Feature Nr. 1 in Tabelle 15 ($m/z = 303,1052$) vier verschiedene Summenformeln mit einer Abweichung < 2 ppm, wenn von einem $[M+H]^+$ -Addukt ausgegangen wird und als Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel in Betracht gezogen werden. Einer dieser Summenformelvorschläge ist $C_{17}H_{18}O_3S$ ($\Delta m/z = -0,86$ ppm). Daraus lassen sich wiederum mehrere hundert mögliche Strukturen ableiten (z.B. Suche bei Chempider), darunter verschiedene aromatische Verbindungen, Ester und Ketone. Eine umfangreiche CCS Datenbank würde hier die Suche nach sinnvollen Verbindungen deutlich beschleunigen und die Zahl der Möglichkeiten ließe sich zumindest stark eingrenzen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass mittels geeigneter Software eine Hauptkomponentenanalyse aus den mit HPLC-IM-qTOF-MS generierten Daten durchgeführt werden kann, die die Unterscheidung von Proben verschiedener Gruppen und das Herausfiltern von für diesen Unterschied charakteristischen Substanzen ermöglicht.

5.2.2 Analyse von *Castanea sativa* mit HPLC-IM-qTOF-MS

Das Durchsuchen von Daten einer HPLC-IM-qTOF-MS Analyse zur Erstellung einer Feature-Liste, wie bereits in 5.2.1 vorgestellt, erfolgt über einen festgelegten Algorithmus der Software. Die Wiederholbarkeit der Feature-Suche für den anschließenden Datenbankabgleich bei Wiederholmessungen einer Probe soll an folgendem Beispiel der Analyse von *Castanea sativa* (Esskastanie) untersucht werden.

Extrakte von Blättern der Esskastanie sind als traditionelle Heilmittel in der Volksmedizin schon lange bekannt und werden gegen Bronchitis, Asthma und andere Atemwegsbeschwerden eingesetzt. Auch wenn das Bundesgesundheitsamt keinen Beleg für die Wirksamkeit sieht [225], ist eine gesundheitsfördernde Wirkung aufgrund der

bisher bekannten Inhaltsstoffe wie Ascorbinsäure und Flavonoide denkbar [226,227]. Neuere Arbeiten beschäftigen sich ausführlich mit der antioxidativen Aktivität von Kastanienblattextrakten und der Identifizierung möglicher phenolischer Inhaltsstoffe [228–230]. Es wurde ein wässriger Extrakt von frischen Blättern der Pflanze hergestellt und mit HPLC-IM-qTOF-MS im negativen ESI Modus dreifach analysiert (Heatmap im Anhang Abbildung 39, S. 112). Durch Feature-Suche und anschließende Datenbanksuche konnten vier verschiedene Substanzen identifiziert werden. Tabelle 16 zeigt die Datenbankeinträge dieser Substanzen und das dazu gefundene Feature in jeder der drei Messungen. Die gleichen Datenbankeinträge konnten in allen drei Messungen gefunden werden. Dabei sind sowohl die Retentionszeiten als auch die Driftzeiten und damit verbunden auch die CCS-Werte sehr gut reproduzierbar.

Tabelle 16: Ergebnisse der Feature-Suche der Messungen Nr. 1-3 von *Castanea sativa*; alle Substanzen wurden als $[M-H]^-$ -Ionen beobachtet und bei der Datenbanksuche mit einer Toleranz von $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ % gefunden

Substanz	Datenbankeintrag		Gefundenes Feature in der HPLC-IM-qTOF-MS Analyse						
	m/z	Ω [Å²]	Nr.	m/z	$\Delta m/z$ [ppm]	Ω [Å²]	$\Delta \Omega$ [%]	t_R [min]	t_D [ms]
Theophyllin	179,0574	134,3	1	179,0569	2,8	133,2	0,8	1,86	16,50
			2	179,0572	1,1	133,0	1,0	1,86	16,48
			3	179,0574	0,0	133,3	0,7	1,85	16,52
Ascorbinsäure	175,0248	130,1	1	175,0245	1,7	130,0	0,1	4,58	16,07
			2	175,0245	1,7	130,1	0,0	4,57	16,08
			3	175,0247	0,6	130,3	-0,2	4,46	16,11
Catechin	289,0717	159,9	1	289,0724	-2,4	158,8	0,7	15,21	20,25
			2	289,0720	-1,0	158,7	0,8	15,20	20,25
			3	289,0723	-2,1	159,1	0,5	15,11	20,29
Rutin	609,1461	236,1	1	609,1472	-1,8	234,4	0,7	22,48	30,73
			2	609,1468	-1,1	234,4	0,7	22,47	30,73
			3	609,1473	-2,0	234,8	0,6	22,45	30,78

Die Abweichungen der gefundenen CCS vom Datenbankeintrag sind für eine Substanz von Messung zu Messung sehr ähnlich und liegen immer unter 1 %. Die Schwankung der m/z-Verhältnisse ist etwas größer. So weicht das m/z-Verhältnis

des als Theophyllin identifizierten Features in Messung 1 mit 2,8 ppm relativ stark vom exakt berechneten Wert aus der Datenbank ab, während der Wert der dritten Messung mit einer Abweichung von 0,0 ppm dem exakten m/z -Verhältnis entspricht. Generell werden bei Messungen im IM-Modus etwas größere Fehler der mittels TOF-MS erhaltenen Massen beobachtet als im reinen qTOF-Betrieb. Das ist damit zu erklären, dass die Ionen, bedingt durch die Funktionsweise des DTIMS, nicht kontinuierlich, sondern gesammelt in Paketen das TOF-Flugrohr und den Detektor erreichen. Dadurch kommt es schneller zu einer Detektorsättigung und einer Ungenauigkeit der ermittelten m/z -Verhältnisse. Es empfiehlt sich daher, bei IM-qTOF-MS Messungen die exakte Masse bei geringeren Intensitäten in der Peakflanke zu bestimmen. Bei der Feature-Suche wird dies von der Software nach Angaben des Herstellers durchaus berücksichtigt. Dennoch können gewisse Schwankungen im Massenspektrum je nach gewählter Position im Peak auftreten. Die in der Feature-Liste angegebenen Intensitäten (*engl. abundance*) liegen bei den drei Wiederholmessungen in der gleichen Größenordnung (ergänzende Tabelle 23 im Anhang S. 113). Die relative Standardabweichung liegt zwischen 3,4 % bei Ascorbinsäure und 14,3 % bei Theophyllin. Für eine quantitative Anwendung wäre die Verwendung eines internen Standards sinnvoll.

5.2.3 Analyse von lipidhaltigen Realproben mit HPLC-IM-qTOF-MS

In 5.1.1.1 wurde die Bestimmung der CCS von Lipiden aus einer komplexen Mischung beschrieben. Um die Anwendbarkeit der CCS Datenbank auf lipidhaltige Proben zu untersuchen, wurden ein Olivenöl und ein Eigelbextrakt mit HPLC-IM-qTOF-MS analysiert. Im Olivenöl sind wegen der typischen Zusammensetzung von Speiseölen fast ausschließlich Triglyceride zu erwarten [231]. Eigelb (Eidotter) besteht zu ca. 33 % aus Lipiden. Davon sind 66 % Triglyceride und 28 % verschiedene Phospholipide. 6 % fallen auf Cholesterin und sonstige Lipide zurück [212]. Die wichtigsten Fraktionen der Phospholipide stellen Phosphatidylcholin (PC) mit 73 % und Phosphatidylethanolamin (PE) mit 15,5 % dar [232]. Daneben finden sich auch Sphingomyeline (SM), Lysophosphatidylcholine (LPC), Lysophosphatidylethanolamine (LPE) und Phosphatidylinositole (PI) [233].

Beispielhaft sind hier die Heatmap (Abbildung 28) und die Ergebnisse der Datenbanksuche (Tabelle 17) für die Eigelbprobe im ESI-negativ Modus dargestellt. Darin

wurden drei Ceramide, zwei Lysophosphatidylethanolamine, fünf Phosphatidylethanolamine und drei verschiedene Phosphatidylinosite detektiert. Nach der Analyse mit positiver Elektrospray-Ionisation (s. Abbildung 40 und Tabelle 24 im Anhang S. 114) sind fünf verschiedene Lysophosphatidylcholine, ein Lysophosphatidylethanolamin, sieben Diacylglycerophosphate, fünf Phosphatidylethanolamine, drei Phosphatidylinosite und drei Sphingomyeline sowie elf verschiedene Triglyceride in dem untersuchten Eigelb vorhanden. Diese Vielfalt an Phospholipiden ist für Eigelb typisch. Auffällig ist, dass einige Lipide wie z.B. LPE 18:0 mehrfach bei verschiedenen Retentionszeiten gefunden werden. Hier könnte eine chromatographische Trennung mehrerer Isomere stattgefunden haben, deren CCS aber sehr ähnlich sind. Wie in 5.1.1.1 beschrieben ist in der Datenbank für jedes Lipid nur ein CCS-Wert vorhanden, auch wenn mehrere Isomere möglich sind. In Olivenöl konnten 23 verschiedene Triglyceride gefunden werden (s. Abbildung 41 und Tabelle 25 im Anhang S. 116). Andere Lipidklassen lieferte die Suche nicht, was den oben genannten Erwartungen

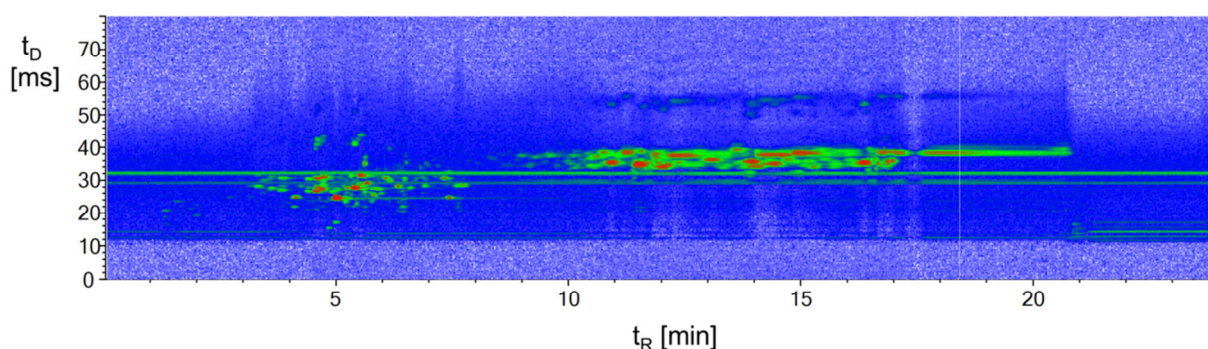


Abbildung 28: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI neg.) eines Eigelbextraktes; Methodenparameter in Tabelle 5

entspricht. Da Triglyceride mit der verwendeten Methode nur im positiven ESI-Modus detektiert werden können, liefert die Analyse von Olivenöl im Negativmodus entsprechend keine Treffer. Die Datenbanksuche über exakte Masse und CCS ist also auch für Lipide anwendbar und ermöglicht die Analyse der in einer Probe vorliegenden Lipidklassen.

Tabelle 17: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI neg.) von Lipiden aus Eigelb mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert

Lipid	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	t_R [min]
Cer 34:1	537,5121	-1,7	[M-H] ⁻	244,5	0,4	13,92
Cer 42:1	649,6373	-1,7	[M-H] ⁻	267,9	-0,4	16,99
Cer 42:2	647,6216	-1,7	[M-H] ⁻	269,5	0,7	16,88
LPE 18:0	481,3168	-2,3	[M-H] ⁻	217,7	-0,2	4,42
LPE 18:0	481,3168	-1,5	[M-H] ⁻	217,7	0,3	5,26
LPE 18:0	481,3168	-3,1	[M-H] ⁻	217,7	0,0	5,42
LPE 18:0	481,3168	-2,9	[M-H] ⁻	217,7	0,4	6,46
LPE 18:1	479,3012	-0,2	[M-H] ⁻	215,1	0,0	4,56
LPE 18:1	479,3012	-1,3	[M-H] ⁻	215,1	0,4	4,71
PE (O/P) 34:1	703,5516	-1,3	[M-H] ⁻	265,3	0,8	15,73
PE (O/P) 34:3	699,5203	-1,4	[M-H] ⁻	263,8	0,4	13,35
PE 33:1	703,5152	-1,7	[M-H] ⁻	262,6	0,5	12,72
PE 34:1	717,5309	-1,0	[M-H] ⁻	267,6	0,9	14,03
PE 34:2	715,5152	-0,6	[M-H] ⁻	265,0	0,3	12,03
PI 34:2	834,5258	-1,7	[M-H] ⁻	287,4	0,9	9,31
PI 36:2	862,5571	-1,5	[M-H] ⁻	294,2	0,7	11,11
PI 36:2	862,5571	-0,9	[M-H] ⁻	294,2	0,0	11,46
PI 36:4	858,5258	-2,3	[M-H] ⁻	291,0	0,8	9,00

5.3 Aufbau einer kontinuierlichen multi-heartcutting Methode (LC+LC) zur Kopplung an ein IM-qTOF-MS

In Abschnitt 5.2 wurde an verschiedenen Beispielen die Trennung komplexer Proben in drei Dimensionen (HPLC, IMS und qTOF-MS) gezeigt. Die Analyse mit komprehensiver zweidimensionaler HPLC gekoppelt an hochauflösende Massenspektrometrie bietet ebenfalls die Möglichkeit, Komponenten einer komplexen Probe in drei verschiedenen Dimensionen zu trennen. Eine Weiterführung dessen ist die Kopplung von 2D-LC mit IM-qTOF-MS, die eine vierdimensionale Tren-

nung ermöglicht, sodass weitere Informationen über die Probe gewonnen werden können. Die Entwicklung und Anwendbarkeit einer solchen vierdimensionalen Methode soll im Folgenden gezeigt werden.

5.3.1 Prinzip der LC+LC

Die wichtigsten Methoden der zweidimensionalen Flüssigchromatographie wurden in 2.2.2 im Detail erklärt. In der Heart-cutting LC werden nur ausgewählte Fraktionen der ersten Trenndimension auf die zweite Dimension übertragen, wobei in der Regel ein vollständiger Peak ausgeschnitten wird. In der LCxLC wird dagegen die gesamte Probe in beiden Dimensionen analysiert. Dabei wird jeder Peak der ersten Dimension in mindestens drei bis vier Fraktionen zerteilt, die nacheinander auf die zweite Dimension gelangen. Jede Komponente erscheint somit in mehreren Chromatogrammen der zweiten Dimension, was zu einer höheren Komplexität der Daten führt. Eine Kopplung von LCxLC an ein IM-qTOF-MS wäre zwar apparativ und technisch möglich, jedoch gibt es bisher keine geeignete Softwarelösung, um die daraus erhaltenen Daten in vier Dimensionen visuell darzustellen. Auch eine Feature-Suche wie für die 1D-LC-IM-qTOF-MS gezeigt wäre hierbei problematisch, weil dabei mit kommerziell erhältlicher Software bisher keine Berücksichtigung von Retentionszeiten in zwei verschiedenen chromatographischen Dimensionen möglich ist. Es sollte daher eine Methode entwickelt werden, bei der alle Analyten einer Probe zwar in zwei verschiedenen (möglichst orthogonalen) flüssigchromatographischen Dimensionen getrennt werden, aber anders als bei der LCxLC nicht fraktioniert werden und daher nach der zweiten Dimension nur als ein Peak eluieren und zum Detektor gelangen. Der Ansatz für eine solche Methode geht zurück auf die 1978 durchgeführten Arbeiten von ERNI und FREI [177]. Darin war die Modulationszeit so lang (7 Fraktionen in 10 Stunden), dass Substanzen, die von der ersten Dimension eluierten, als Ganzes in einer Fraktion gesammelt und auf die zweite Dimension injiziert wurden. In Anlehnung daran wurde hier eine Modulationszeit von 4 Minuten gewählt, die im Vergleich zu LCxLC-Methoden (meist 0,5 bis 1 Minute) relativ lang ist. Die Trennung in der ersten Dimension wird dadurch reduziert, sodass nicht mehr alle Kriterien nach [179] erfüllt sind und die Methode nicht als comprehensive 2D-LC bezeichnet werden kann. Da nun — ähnlich wie in der Heart-cutting LC — ganze Peaks auf die zweite Dimension gelangen und dies mit der kompletten Probe geschieht, kann die Methode auch als konti-

nuierliche multi-heartcutting Methode beschrieben werden, die zwischen heart-cutting und komprehensiver 2D-LC einzuordnen ist. Als Abgrenzung zu LC-LC und LCxLC wurde in dieser Arbeit die Abkürzung LC+LC eingeführt [234]. Die Aufeinanderfolge der vier Trenndimensionen bei der Kopplung von LC+LC mit IM-qTOF-MS zeigt das Schema in Abbildung 29. Die Komponenten einer Probe werden dabei zunächst in der ersten Dimension chromatographisch getrennt und das Eluat in Fraktionen von je 4 Minuten gesammelt. Dabei bleiben die Peaks – bis auf wenige Ausnahmen, die genau zwischen zwei Modulationen eluieren – vollständig in einer Fraktion. Die Fraktionen werden anschließend nacheinander auf der zweiten Dimension chromatographisch getrennt, wobei hierfür entsprechend der Modulationszeit 4 Minuten zur Verfügung stehen. Das Eluat der zweiten Dimension mit Peaks von einigen Sekunden Breite gelangt nach Ionisation in die Driftröhre als dritte Dimension, wo die Analyten nach ihrem Größe-zu-Ladungsverhältnis mit Driftzeiten im Millisekundenbereich getrennt werden. Hinter der Driftröhre gelangen die Ionen in das TOF-Flugrohr, in dem die Trennung nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen im Zeitrahmen von Mikrosekunden stattfindet.

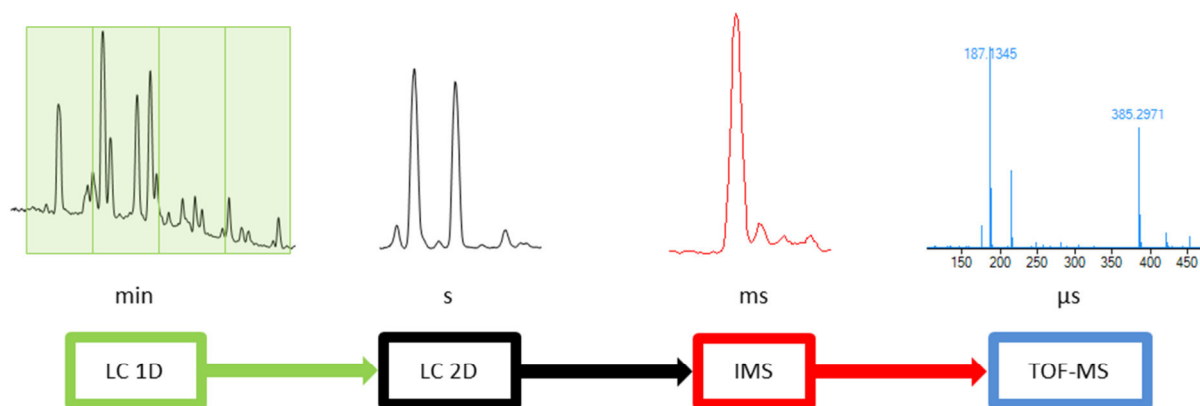


Abbildung 29: Schema der Trennung in vier Dimensionen bei der LC+LC-IM-qTOF-MS

5.3.2 Aufbau des Systems

Um die LC+LC-Methode zu realisieren, wurde zunächst ein 2D-LC System mit zwei Pumpen für die erste und die zweite Dimension und einem 2-Pos/4-Port-Ventil mit zwei Probenschleifen verwendet. Die Modulationszeit wurde auf vier Minuten festgelegt. Da in dieser langen Sammelzeit die Volumina der Fraktionen sehr groß werden,

sollte zumindest der Innendurchmesser der Säule in der ersten Dimension eher klein und der Fluss ebenfalls gering sein. Die Trennung der ersten Dimension geht aus oben genannten Gründen teilweise verloren, weshalb durch eine lange Säule zumindest eine möglichst hohe Trennleistung erzielt werden soll. Für die erste Dimension wurde deshalb eine Säule mit 150 mm Länge und einem Innendurchmesser von 2,0 mm (Luna CN 3,0 μm) sowie ein relativ langsamer Fluss (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) gewählt. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte aufgrund der langen Modulationszeit in großen Probenschleifen von 100 μL Volumen. In der zweiten Dimension stehen entsprechend der Modulation nur vier Minuten für die Trennung zur Verfügung, was die Verwendung kürzerer Säulen erfordert. Da das gesamte Fraktionsvolumen von 100 μL auf einmal in die zweite Säule injiziert wird, empfiehlt sich ein größerer Innendurchmesser, bei dem sich das Injektionsvolumen auf eine größere Fläche verteilt und somit am Anfang eine schmalere Substanzbande vorliegt [235]. Hier wurde eine Säule mit 50 mm Länge und 3,0 mm Innendurchmesser eingesetzt (Kinetex C18 2,6 μm). Der Fluss in der zweiten Dimension wurde auf 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ festgesetzt, was dem optimalen Fluss für die verwendete ESI-Ionenquelle entspricht. Dieser Fluss ist langsamer als bei LCxLC-Methoden üblich (2 bis 4 mL/min [236]). So wurde aber ein zusätzlicher Split nach der zweiten Dimension und damit ein Sensitivitätsverlust vermieden, der ansonsten notwendig gewesen wäre, um den anwendbaren Flussbereich der Ionenquelle nicht zu übersteigen. Es konnte in der Analysenzeit von vier Minuten dennoch eine ausreichende Trennung in der zweiten Dimension erreicht werden.

Das Injektionsvolumen auf die zweite Säule ist wie bereits erwähnt mit 100 μL sehr hoch. Dies kann – bei Verwendung einer RP Phase – zu einer starken Peakverbreiterung in der zweiten Dimension führen, vor allem wenn der Anteil an organischem Lösungsmittel im Eluenten der ersten Dimension hoch und damit die Elutionskraft sehr stark ist [237]. Um dies zu vermeiden, wurde das Eluat hinter der ersten Dimension zunächst mit Wasser verdünnt, sodass eine Fokussierung der Analyten am Anfang der zweiten Säule stattfinden konnte [238]. Dadurch können die Gradienten der ersten und der zweiten Dimension unabhängig voneinander optimiert werden. Die Verdünnung wurde durch kontinuierliches Zumischen von Wasser mit 0,1 % Ameisensäure über eine zusätzliche HPLC-Pumpe (Pumpenkopf B, s. Abbildung 30) reali-

siert. In der Mischkammer dieser Pumpe wurden Eluat und Wasser vollständig durchmischt, bevor der gesamte Fluss durch Saugen des Pumpenkopfs A über ein T-Stück zusätzlich geteilt wurde (*engl. dilute-and-split*). Daraus resultierte ein Fluss von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, sodass die Probenschleifen innerhalb von 4 Minuten zu 80 % gefüllt wurden. Ein Verlust einzelner Komponenten durch Überfüllen konnte somit ausgeschlossen werden. In der zweiten Dimension wurde mit einem Shift-Gradienten gearbeitet. Dabei wurde während der ersten Modulation ein linearer Gradient von 10 bis 60 % Methanol gefahren. In den nachfolgenden Modulationen startete der Gradient immer mit einem etwas höheren Anteil an organischem Lösungsmittel, so dass während der letzten Modulation ein Gradient von 50 bis 90 % Methanol lief. Damit erfassen Substanzen, die spät von der ersten Säule eluieren, in der zweiten Dimension direkt eine stärkere Elutionskraft. Diese Technik hat sich in der LCxLC vor allem bei der Kombination von zwei Umkehrphasen bewährt, um die bestmögliche Ausnutzung der Trennfläche und eine hohe Peakkapazität zu erreichen [239]. Nach der Trennung in der zweiten Dimension gelangt der Fluss durch die Messzelle eines Diodenarray-Detektors, wo zusätzliche Informationen über die UV-Absorption gewonnen werden können, in die Ionenquelle (hier ESI) zur weiteren Analyse mit IM-qTOF-MS.

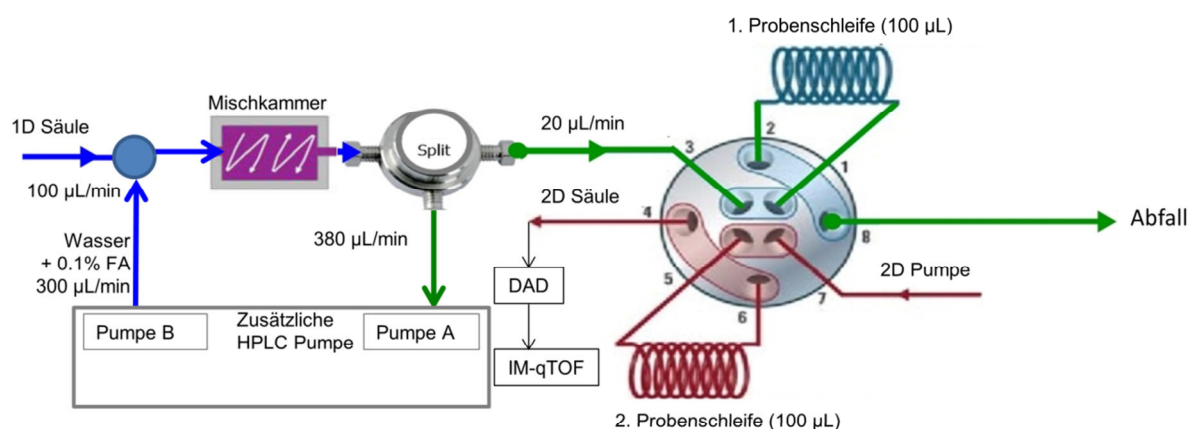


Abbildung 30: Aufbau des LC+LC-Systems. Das Eluat der ersten Dimension (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) wird kontinuierlich mit Wasser (300 $\mu\text{L}/\text{min}$) verdünnt. Hinter der Mischkammer wird mit einem Fluss von 380 $\mu\text{L}/\text{min}$ über ein T-Stück abgesaugt, sodass die Probenschleifen mit verdünntem Eluat (20 $\mu\text{L}/\text{min}$) gefüllt werden.

5.3.3 Analyse von *Ginkgo biloba*

Die Entwicklung und Charakterisierung der LC+LC-Methode wurde mit einem methanolischen Extrakt von Blättern der Pflanze *Ginkgo biloba* durchgeführt [234]. Ginkgo-Extrakte werden häufig zu medizinischen oder diätetischen Zwecken in Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt [240]. Dabei sind Wirkungen unter anderem gegen Asthma, Herz-Kreislauf-erkrankungen [241] und Tinnitus [242] bekannt. Zu den wichtigsten Inhaltsstoffen zählen Flavonoide und die sogenannten Ginkgolide (Terpenlactone) [241,243] sowie Catechine [244].

Der Contourplot in Abbildung 31 zeigt die Trennung in den beiden flüssigchromatographischen Dimensionen der LC+LC (hier von einer Messung im qTOF-only Modus, da nur für diese Datenfiles die Subtraktion eines Blindwertes möglich war). Jede Modulation ist darin als vertikaler Streifen von 4 Minuten Breite zu erkennen (erste Dimension). Die Trennung in der zweiten Dimension kann für jede Modulation entlang der y-Achse betrachtet werden. Es konnte eine Vielzahl an Komponenten getrennt werden, die über einen großen Teil der zur Verfügung stehenden Trennfläche verteilt sind.

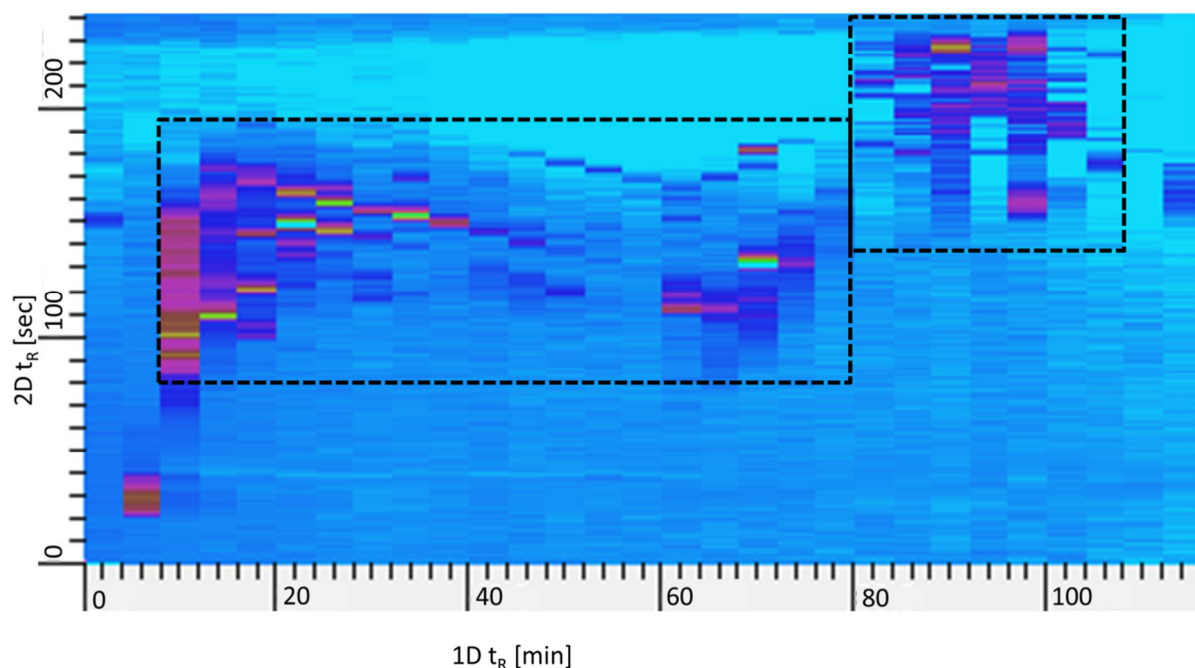


Abbildung 31: Contourplot der LC+LC-qTOF Analyse von *Ginkgo biloba* (TIC nach Blanksubtraktion). Die gestrichelten Linien markieren die Fläche A_{eff} für die Berechnung der Peakkapazität in 5.3.3.2

Die gleiche Probe wurde mit LC+LC im IM Modus analysiert. Da einzelne Analyten wie in 5.3.1 erläutert bei der LC+LC-Trennung nur in einer Fraktion enthalten sein sollten, kann hier eine Retentionszeit für beide LC-Trenndimensionen zusammen angegeben werden. Somit wird die Darstellung der Daten in einer Heatmap mit Driftzeit gegen Retentionszeit, wie bereits in Abschnitt 5.2 für 1D-LC-IM-qTOF-MS-Analysen gezeigt, möglich (Abbildung 32 a). Ein Ausschnitt von 8-12 Minuten stellt die Trennung während einer Modulation dar (Abbildung 32 b). Darin wird der Beitrag der zweiten Dimension (horizontale Richtung) und der Ionenmobilitätsspektrometrie als dritte Dimension (vertikale Richtung) deutlich. Extrahieren von Driftspektrum und Massenspektrum in einem schmalen Retentionzeitabschnitt (9,63-9,76 Minuten) liefert Abbildung 32 c, in der die weitere Auftrennung eines Peaks hinter der zweiten Dimension nach Driftzeit im IMS (dritte Dimension) und nach m/z -Verhältnis im TOF-Massenspektrometer (vierte Dimension) zu erkennen ist. Ein herangezoomter Ausschnitt (Abbildung 32 d) zeigt einen Peak im Massenspektrum ($m/z = 379,1001$), der im Driftspektrum in zwei Signale (23,12 und 24,85 ms) aufgetrennt ist. Dies ist ein Beispiel für isobare Substanzen, die nach zwei chromatographischen Dimensionen immer noch coeluieren und aufgrund ihres gleichen m/z -Verhältnisses massenspektrometrisch nicht unterscheidbar sind, aber durch einen Unterschied in ihrer Struktur andere CCS aufweisen und daher mittels IMS getrennt werden können.

5.3.3.1 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zu untersuchen wurde der gleiche *Ginkgo biloba* Extrakt – mit Colchicin als internem Standard versetzt – an drei verschiedenen Tagen je dreimal injiziert und mit LC+LC-IM-qTOF-MS analysiert. Nach dem Prinzip der LC+LC Methode kann hier für jede Substanz eine Retentionszeit angegeben werden, die sich als Summe aus der Retentionszeit der ersten Dimension (4 Minuten Modulationszeit multipliziert mit der Nummer der Fraktion) und der Retentionszeit in der zweiten Dimension ergibt. Der interne Standard Colchicin wurde in allen Wiederholmessungen bei einer durchschnittlichen Retentionszeit von 69,97 Minuten mit einer relativen Standardabweichung von 0,01 % gefunden. Rutin, ein Flavonoid, das als eine der Hauptkinhaltsstoffe in *Ginkgo biloba* bekannt ist [241], wies eine durchschnittliche Retentionszeit von 22,50 Minuten und eine relative Standardabweichung von 0,03 % auf.

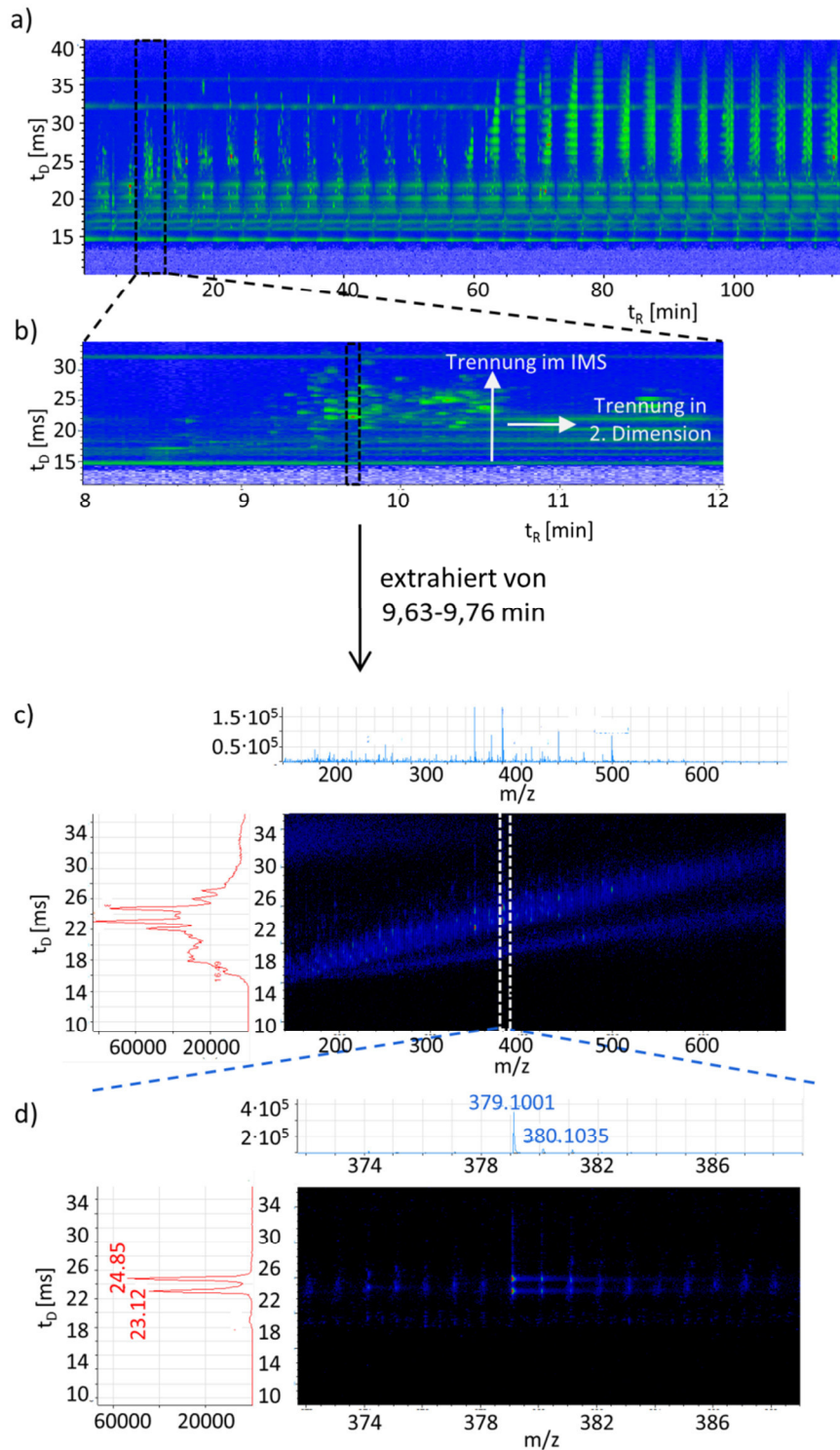


Abbildung 32: a) Heatmap der LC+LC-IM-qTOF-MS-Analyse (ESI pos.) eines *Ginkgo biloba* Extrakts. b) Ausschnitt der Heatmap mit Trennung einer Fraktion (gesammelt zwischen 4 und 8 Minuten) in der zweiten Dimension (Elution von der zweiten Säule zwischen 8 und 12 Minuten). c) Driftspektrum (rot), Massenspektrum (blau) und 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) extrahiert bei $t_R=9,63$ bis $9,76$ min. d) Ein vergrößerter Ausschnitt zeigt die Trennung von zwei Peaks mit dem gleichen m/z-Verhältnis in der IM Dimension. Methodenparameter in Tabelle 7.

Zusätzlich wurde Rutin in einem methanolischen Extrakt von Kastanienblättern (*Castanea sativa*) mit einer Retentionszeit von 22,52 Minuten gefunden (s. Tabelle 28 im Anhang S. 120) was zeigt, dass die Retentionszeiten auch für andere Matrices gut reproduzierbar sind. Weiterhin wurden acht Peaks zwischen 9,45 und 111,04 Minuten mit m/z -Verhältnissen zwischen 205,0972 und 763,2044 zufällig ausgewählt und ebenfalls die Retentionszeiten in allen Wiederholmessungen ausgewertet. Dabei ergaben sich relative Standardabweichungen zwischen 0,01 und 0,07 %. Diese insgesamt sehr gute Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten kann damit erklärt werden, dass die Analyten durch die Verdünnung mit Wasser am Anfang der zweiten Säule vor der Trennung nochmals fokussiert werden.

In vier aufeinanderfolgenden Analysen wurden die Peakflächenverhältnisse zweier Substanzen betrachtet. Dabei wurden der interne Standard Colchicin ($m/z = 400,1755$) und ein Peak mit ähnlichem Retentionsverhalten ($m/z = 763,1849$) ausgewählt. Das Peakflächenverhältnis beider Substanzen hatte zwischen den vier Messungen eine relative Standardabweichung von 5,1 %. Über interne Standards könnte die LC+LC-Methode also auch durchaus zur Quantifizierung eingesetzt werden. Dabei ergibt sich gegenüber LCxLC-Anwendungen der Vorteil, dass in der Regel nur ein Peak pro Analyt integriert werden muss.

5.3.3.2 Peakkapazität

Die gesamte Peakkapazität dieser Methode setzt sich zusammen aus den Peakkapazitäten der beiden chromatographischen Dimensionen und der Ionenmobilitätspektrometrie. In Analogie zu [188] ergibt sich die maximale Anzahl getrennter Peaks P_{ges} als Produkt aus der Peakkapazität der 2D-LC Trennung, $^{LC+LC}n$, und der Peakkapazität der IM-Dimension ^{IM}n :

$$P_{ges} = ^{LC+LC}n \cdot ^{IM}n$$

Gleichung 30

Unter optimalen, vollständig orthogonalen Bedingungen kann die Peakkapazität einer zweidimensionalen Trennung nach Gleichung 21 als Produkt der beiden Dimensionen berechnet werden. Da bei der entwickelten LC+LC-Methode wegen der langen Modulationszeit von 4 Minuten die Auflösung der ersten Dimension verloren geht, wird hier für die Peakkapazität der ersten Dimension 1n die Anzahl der Fraktionen,

die während des gesamten Laufes von $t_{ges} = 120$ Minuten in die zweite Dimension gelangen, eingesetzt:

$$^1n = \frac{t_{ges}}{4 \text{ min}} - 1 = \frac{120 \text{ min}}{4 \text{ min}} - 1 = 29$$

Gleichung 31

Die Peakkapazität der LC+LC-Trennung kann so für eine völlig orthogonale Trennung nach Kombination von Gleichung 31 und Gleichung 21 berechnet werden:

$$^{LC+LC}n = \left(\frac{120 \text{ min}}{4 \text{ min}} - 1 \right) \cdot ^2n$$

Gleichung 32

Da absolut orthogonale Bedingungen nicht vorliegen und nach [190] und [191] auch kaum erreicht werden können, muss Gleichung 32 um einen Orthogonalitätsfaktor O_A gemäß Gleichung 22 ergänzt werden. O_A ist dabei der Anteil der effektiven Fläche A_{eff} an der gesamten Fläche A wie im Contourplot in Abbildung 31 eingezeichnet.

$$^{LC+LC}n = O_A \cdot \left(\frac{120 \text{ min}}{4 \text{ min}} - 1 \right) \cdot ^2n = \frac{A_{eff}}{A} \cdot \left(\frac{120 \text{ min}}{4 \text{ min}} - 1 \right) \cdot ^2n$$

Gleichung 33

Aus Abbildung 31 ergibt sich mit $A_{eff} = 174$ und $A = 480$ ein Orthogonalitätsfaktor von $O_A = 0,36$. Für die Peakkapazität in einer Dimension gilt Gleichung 20, die hier zur Berechnung der Peakkapazität in der zweiten und in der IM Dimension herangezogen wird. Dafür wurden jeweils drei Peaks vom Anfang, aus der Mitte und vom Ende eines 2D-Chromatogramms bzw. eines Driftspektrums ausgewählt und die Peakbasisbreite w_b als Mittelwert davon bestimmt. In der zweiten Dimension ergibt sich so mit einer Laufzeit von 4 Minuten und $w_b = 0,13$ Minuten eine Peakkapazität von $^2n = 31$. In der IM Dimension wird hier nur die Zeit zwischen 14 und 36 ms berücksichtigt, in der in Abbildung 32 a tatsächlich Signale sichtbar sind. Somit resultiert bei $t = 22$ ms und $w_b = 0,83$ ms eine maximale Anzahl von $^{IM}n = 27$ getrennten Peaks in der IM Dimension. Einsetzen der ermittelten Werte in Gleichung 33 liefert als Peakkapazität der LC+LC-Trennung $^{LC+LC}n = 324$. Als gesamte Peakkapazität der LC+LC-IM-MS Methode kann hier nach Gleichung 30 $P_{ges} = 8748$ berechnet werden.

Bei dieser Berechnung handelt es sich immer noch um eine Näherung, da nicht verhindert werden kann, dass einige Substanzen einmal moduliert werden und so zwei Peaks für eine Substanz erscheinen. In der IM Dimension können außerdem mehrere Peaks für einen Analyten auftreten, wenn dieser verschiedene Addukte bildet oder in der Ionenquelle teilweise fragmentiert. Dennoch wird die hohe Trennleistung der Methode deutlich. Auch wenn die Zahl der Fraktionen auf 29 limitiert ist und dadurch die Peakkapazität der LC+LC-Trennung mit 324 geringer ist als bei vergleichbaren LCxLC-Methoden, kann durch die Einführung der Ionenmobilitätsspektrometrie als dritte Trenndimension eine sehr hohe Trennleistung mit einer Peakkapazität von über 8000 erzielt werden.

5.3.3.3 Identifizierung von Inhaltsstoffen über die CCS Datenbank

Nach der Analyse mit LC+LC-IM-qTOF-MS kann, genau wie bereits in 5.2 an verschiedenen Beispielen für 1D-LC-IM-qTOF-MS Messungen gezeigt, eine Feature-Suche durchgeführt werden, bei der zu jedem Feature die Collision Cross Section aus der Driftzeit über die Single-Field Methode berechnet wird. Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der Suche in der CCS Datenbank mit m/z (± 5 ppm) und Ω (± 1 %) für die gefundenen Feature nach einer LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse der *Ginkgo biloba* Probe. Darin konnten 7 Substanzen identifiziert werden. Bei einer davon handelt es sich um Colchicin, das der Probe als interner Standard zugegeben wurde. Die Flavonoide Quercetin, Kaempferol und Isorhamnetin sowie das glykosidisch gebundene Rutin sind als typische Inhaltsstoffe in Ginkgo bekannt [240,241]. Rutin wurde hier sowohl über sein $[M+H]^+$ -Addukt als auch über das $[M+Na]^+$ -Addukt gefunden. In diesem Fall treten beide Addukte zweimal – wegen des Shift-Gradienten im Abstand von etwas weniger als 4 Minuten – auf. Demzufolge hat Rutin die erste Säule genau zwischen zwei Modulationen verlassen und war so in zwei Fraktionen enthalten. In diesem Fall müssten für eine quantitative Aussage beide Peaks integriert und die Flächen summiert werden. Gallocatechin, das ebenfalls neben anderen Catechinen in Ginkgoblättern zu finden ist [244], wurde hier im Abstand von 0,35 Minuten, also innerhalb einer Modulation, zweimal gefunden. Durch Injektion eines Gallocatechinstandards konnte der erste der beiden Peaks bei 9,21 Minuten als Gallocatechin bestätigt werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem anderen Peak, der mit 0,5 % auch stärker vom CCS Datenbankwert abweicht als der erste, um eine isobare Sub-

stanz mit sehr ähnlicher Struktur und Größe, die in der Datenbank bisher nicht enthalten ist. Es kann also festgestellt werden, dass eine gute chromatographische Trennung bei IM-MS Analysen komplexer Proben nach wie vor sehr wichtig ist.

Tabelle 18: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse von *Ginkgo biloba* mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	Summenformel	Substanz
9,21	306,0740	2,0	H ⁺	173,1	-0,1	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	Gallocatechin
9,47	204,0899	-0,5	H ⁺	151,9	0,9	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Tryptophan
9,56	306,0740	0,7	H ⁺	173,1	-0,5	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	Gallocatechin
22,51	610,1534	-0,2	H ⁺	234,4	0,6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin
22,51	610,1534	-0,3	Na ⁺	249,4	0,6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin
26,45	610,1534	0,2	H ⁺	234,4	0,5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin
26,45	610,1534	-0,9	Na ⁺	249,4	0,6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin
26,47	302,0427	-1,0	H ⁺	168,1	0,0	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetin
69,97	399,1682	-1,2	H ⁺	197,8	0,9	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	Colchicin
74,52	286,0477	-3,8	H ⁺	163,6	0,3	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol
74,57	316,0583	0,3	H ⁺	171,6	0,6	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Isorhamnetin

Nach dem gleichen Prinzip wurden eine Kaffeeprobe sowie ein wässriger und ein methanolischer Extrakt von *Castanea sativa* Blättern analysiert. Die Ergebnisse dazu befinden sich im Anhang (Abbildung 42, Abbildung 43 und Abbildung 44 bzw. Tabelle 26, Tabelle 27 und Tabelle 28, S. 118 ff).

5.3.4 Non-target Analyse einer Abwasserprobe mit HPLC-IM-qTOF-MS und LC+LC-IM-qTOF-MS

Die in dieser Arbeit aufgebaute CCS Datenbank bietet wie bereits gezeigt die Möglichkeit non-target Analysen durchzuführen, in denen vorab keine Informationen zu den Inhaltsstoffen einer Probe bekannt sind. Dabei werden komplexe Proben mittels HPLC- oder LC+LC-IM-qTOF-MS getrennt und Inhaltsstoffe über deren exakte Masse und CCS identifiziert. Limitierend ist dabei die Größe der Datenbank, die nach und

nach erweitert werden muss. Da bisher unter anderem eine große Zahl an abwasser-relevanten Substanzen wie Pharmazeutika und Pestizide darin enthalten ist, soll im Folgenden zum Vergleich eine non-target Analyse von Abwasser mit eindimensionaler HPLC-IM-qTOF-MS und mit zweidimensionaler LC+LC-IM-qTOF-MS gezeigt werden.

Anthropogene Substanzen wie Pharmazeutika, Pestizide und kosmetische Produkte werden in die Umwelt freigesetzt und gelangen so in den Wasserkreislauf. Verschiedene Wasserproben haben komplexe Matrices und können tausende verschiedener Kontaminanten enthalten, die möglichst mit einer analytischen non-target Methode [245] in kurzer Zeit umfassend identifiziert werden sollen [246]. Am häufigsten werden zurzeit LC-MS Systeme, oft mit hochauflösender Massenspektrometrie, für die Analyse dieser Kontaminanten und deren Metabolite [247–249] in Abwasser und natürlichen Gewässern [250,251] eingesetzt.

Es stand eine im Klärwerk Vierlinden in Duisburg entnommene und mittels Festphasenextraktion aufbereitete Abwasserprobe zur Verfügung. Abbildung 33 zeigt die Heatmap einer Trennung dieser sichtlich komplexen Probe mit HPLC-IM-qTOF-MS. Eine Feature-Analyse mit anschließender Suche in der CCS Datenbank ($m/z \pm 5$ ppm und $\Omega \pm 1$ %) ergab 22 verschiedene Komponenten, von denen 19 als $[M+H]^+$ -Addukte und 3 als $[M+Na]^+$ -Addukte gefunden wurden (s. Tabelle 19). Alle Substanzen konnten Gruppen von Pharmazeutika oder Pestiziden und bekannten Metaboliten davon zugeordnet werden. Als Beispiel für die Unterscheidung von Isobaren kann hier Tramadol genannt werden. Allein die exakte Masse (263,1885 Da) könnte sowohl Tramadol als auch der Substanz Desvenlafaxin, die die gleiche Summenformel besitzt, zugeordnet werden. Da dieses Substanzpaar aber, wie in 5.1.2.1 festgestellt, anhand ihrer CCS-Werte unterschieden werden kann, ergab die Datenbanksuche hier eindeutig Tramadol. Dass hier drei Peaks als Tramadol erkannt wurden (6,82, 8,37 und 10,25 Minuten) könnte damit erklärt werden, dass die Probe noch weitere strukturell sehr ähnliche Substanzen enthält, die in der Datenbank bisher nicht bekannt sind. Für das Signal bei 18,56 Minuten ist eine Unterscheidung zwischen den beiden isobaren Substanzen Estron und Trenbolon (270,1620 Da) nicht möglich, da deren Stoßquerschnitte zu ähnlich sind (vgl. 5.1.2.1). Auch wenn die Abweichung der CCS von Trenbolon mit 0,0 % besser ist als von Estron (0,5 %),

kann hier keine sichere Aussage getroffen werden, da beide Treffer im bewährten Toleranzbereich von 1 % liegen.

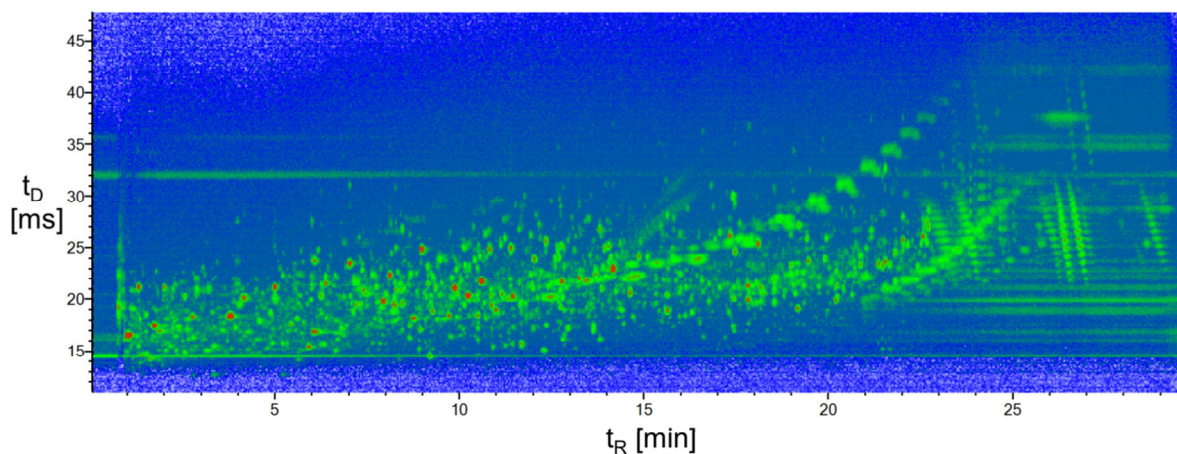


Abbildung 33: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) von Abwasser; Methodenparameter in Tabelle 6

Tabelle 19: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-qTOF-MS Analyse von Abwasser mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. Zusätzlich ist angegeben, zu welcher Gruppe von Kontaminanten die Substanz zählt.

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	Substanz	Gruppe
2,81	164,0950	0,0	H ⁺	133,6	0,0	Fenuron	Herbizid
6,82	263,1885	0,8	H ⁺	161,1	0,4	Tramadol	Analgetikum
8,24	231,1008	-3,4	H ⁺	149,9	-0,2	4-Formyl- aminoantipyrin	Metabolit
8,37	263,1885	0,4	H ⁺	161,1	0,5	Tramadol	Analgetikum
8,67	290,1379	2,1	H ⁺	174,0	-0,3	Trimethoprim	Analgetikum
9,86	265,1579	3,0	H ⁺	159,7	-0,1	Mirtazapin	Antidepressivum
10,25	263,1885	-0,4	H ⁺	161,1	-0,2	Tramadol	Analgetikum
10,62	267,1834	-2,2	H ⁺	172,2	-0,1	Metoprolol	Betablocker
11,21	278,0837	1,8	H ⁺	163,5	0,2	Sulfadimidin	Antibiotikum
12,70	748,5085	-2,7	H ⁺	263,4	-0,5	Azithromycin	Antibiotikum
12,73	325,2253	3,1	H ⁺	187,8	-0,5	Bisoprolol	Betablocker
13,10	277,2042	-0,4	H ⁺	171,4	-0,1	Venlafaxin	Antidepressivum
13,86	424,1799	2,1	H ⁺	202,7	-0,3	Clindamycin	Antibiotikum

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	Substanz	Gruppe
15,57	292,0979	0,7	H ⁺	173,2	0,3	Climbazole	Antimykotikum
15,66	236,0950	-0,4	Na ⁺	161,9	-0,2	Carbamazepin	Analgetikum
16,14	198,1732	1,0	H ⁺	148,9	0,1	Cycluron	Herbizid
16,31	241,1361	1,2	H ⁺	159,4	-0,3	Terbutryn	Herbizid
16,54	191,1310	-4,7	H ⁺	143,2	-0,5	DEET (Diethyltoluamid)	Insektenschutzmittel
17,87	836,5246	-1,0	Na ⁺	278,3	-0,7	Roxithromycin	Antibiotikum
18,12	440,1597	-2,3	H ⁺	196,3	-0,3	Candesartan	Herz-Kreislauf- Medikament
18,56	270,1620	0,4	H ⁺	165,5	-0,5	Estron	Östrogen
	270,1620	0,4	H ⁺	166,3	0,0	Trenbolon	Anabolikum
20,26	295,0167	2,4	H ⁺	159,1	-0,2	Diclofenac	Antiphlogistikum
20,49	290,0822	0,7	H ⁺	175,2	0,3	Chloroxuron	Herbizid

Die gleiche Abwasserprobe wurde mit LC+LC-IM-qTOF-MS gemessen. Die Heatmap in Abbildung 34 a zeigt deutlich die Verteilung einer Vielzahl an Komponenten auf die Fraktionen der ersten Dimension, die in der zweiten Dimension eine weitere starke Auftrennung erfahren und im IMS noch weiter nach Driftzeiten getrennt werden (s. Ausschnitt in Abbildung 34 b). Über die Datenbanksuche konnten hier 53 Komponenten identifiziert werden (s. Tabelle 20), also mehr als doppelt so viele wie nach der eindimensionalen HPLC-IM-qTOF-MS Analyse. Zudem wurden hier mehr Substanzen sowohl über ihr $[M+H]^+$ -Ion als auch ihr Natriumaddukt gefunden. Es wurden, bis auf eine Ausnahme (Chloroxuron), alle Analyten aus Tabelle 19 gefunden. Außerdem taucht hier Tramadol nur noch einmal auf. Diese Abweichungen sind möglicherweise damit zu erklären, dass durch die Verdünnung (*dilute-and-split*) in der LC+LC-Methode Sensitivität verloren geht. Insgesamt kann aber eine deutlich größere Anzahl an Peaks detektiert und zugeordnet werden, da die zweidimensionale

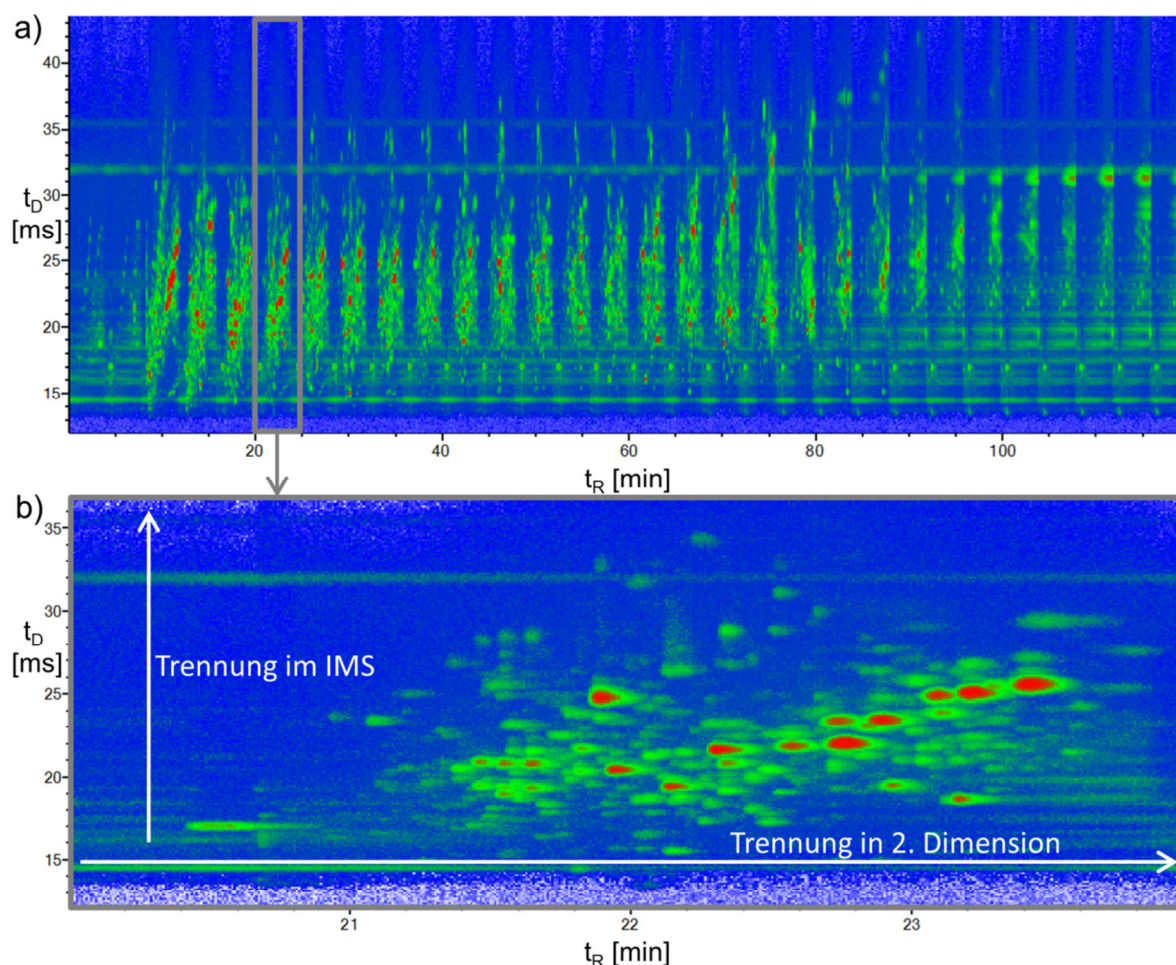


Abbildung 34: a) Heatmap der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) von Abwasser b) Ausschnitt der Heatmap mit Trennung einer Fraktion (gesammelt zwischen 16 und 20 Minuten) in der zweiten Dimension (Elution von der zweiten Säule zwischen 20 und 24 Minuten); Methodenparameter in Tabelle 7

Trennung deutlich besser ist als die eindimensionale und dadurch weniger Ionensuppression entsteht. Zudem werden durch eine verbesserte Vortrennung auch aussagekräftigere MS-Spektren erhalten, die die Feature-Analyse begünstigen. Allerdings kann auch hier bei dem Peak bei 79,24 Minuten nicht eindeutig zwischen Estron und Trenbolon unterschieden werden. Die beiden Isobare 4-Methylbenzotriazol (4-MBTZ) und 5-MBTZ sind ebenfalls strukturell zu ähnlich (vgl. 5.1.2.1), sodass der Peak bei 30,25 Minuten nicht eindeutig zugeordnet werden kann. Das bereits oben diskutierte Isobarenpaar Tramadol und Desvenlafaxin wurde hier chromatographisch getrennt und beide Substanzen wurden über ihre CCS-Werte eindeutig erkannt (13,85 und 25,72 Minuten). Die Retentionszeit von Tramadol bei 25,7 Minuten wurde zusätzlich durch die Injektion eines Standards bestätigt. Als wei-

teres Substanzpaar sind hier Ifosfamid und Cyclophosphamid interessant. Diese weisen in Form von $[M+H]^+$ -Addukten sehr ähnliche Stoßquerschnitte auf, können aber anhand der CCS-Werte ihrer $[M+Na]^+$ -Addukte unterschieden werden. Somit ist eine Identifizierung von Ifosfamid bei 22,32 Minuten und von Cyclophosphamid bei 22,45 Minuten möglich. Es sollten daher grundsätzlich alle gebildeten Adduktionen betrachtet werden.

Hier wurden bewusst zwei Methoden ausgewählt, die als gebräuchliche Standardmethoden die Anwendbarkeit der non-target Analyse mithilfe der CCS Datenbank zeigen sollten. Auch wenn aufgrund der unterschiedlichen Laufzeiten (30 Minuten HPLC-IM-qTOF-MS und 120 Minuten LC+LC-IM-qTOF-MS) ein direkter Vergleich nicht ganz einfach ist, kann über die Anzahl der detektierten Signale in Anlehnung an [252] eine Aussage über die Trennleistung beider Methoden getroffen werden. Durch die bessere Trennung in zwei LC Dimensionen, die zu weniger Ionensuppression und insgesamt saubereren MS-Spektren führt, konnten hier mit der LC+LC-Methode mehr Feature gefunden und identifiziert werden als mit der eindimensionalen HPLC. Dafür ist zwar mehr Analysenzeit erforderlich, es können aber in dieser Zeit auch mehr Informationen über die Probe gewonnen werden.

Tabelle 20: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse von Abwasser mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. Zusätzlich ist angegeben zu welcher Gruppe von Kontaminanten die Substanz zählt.

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	Substanz	Gruppe
9,01	272,1195	-1,1	H+	167,5	0,4	Sotalol	Blutdrucksenker
11,53	279,1471	1,4	H+	159,2	-0,3	Metalaxyl	Fungizid
11,53	279,1471	4,3	Na+	173,6	0,2	Metolachlor-carbonsäure	Metabolit
13,85	263,1885	-1,0	Na+	176,8	0,2	Desvenlafaxin	Antidepressivum
	263,1885	0,0	H+	167,0	0,1	Desvenlafaxin	
17,33	249,0572	-4,4	Na+	164,4	0,4	Sulfapyridin	Antibiotikum
17,47	290,1379	1,7	H ⁺	174,0	0,1	Trimethoprim	Antibiotikum
17,49	231,1008	-1,7	H ⁺	149,9	-0,1	4-Formyl-aminoantipyrin	Metabolit
18,44	236,1161	-2,3	Na ⁺	165,9	0,8	Carbetamid	Herbizid

Ergebnisse und Diskussion

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	Δm/z [ppm]	Addukt	Ω [Å²]	ΔΩ [%]	Substanz	Gruppe
18,58	424,1799	-0,9	Na ⁺	207,3	-0,5	Clindamycin	Antibiotikum
	424,1799	2,6	H ⁺	202,7	0,0	Clindamycin	
21,47	245,1164	-0,8	H ⁺	155,2	0,0	4-Acetamido- antipyrin	Metabolit
21,56	238,1106	-3,3	H ⁺	151,4	-0,1	10,11-Dihydro- carbamazepin	Metabolit
21,76	331,1332	-1,2	H ⁺	177,1	0,5	Ciprofloxacin	Antibiotikum
21,98	278,0837	-0,4	H ⁺	163,5	0,4	Sulfadimidine	Antibiotikum
22,32	260,0248	2,5	Na ⁺	158,7	0,1	Ifosfamid	Zytostatikum
	260,0248	-1,5	H ⁺	147,3	-0,5	Cyclophosphamid	Zytostatikum
	260,0248	-1,5	H ⁺	147,7	-0,3	Ifosfamid	
22,45	260,0248	3,2	Na ⁺	155,2	0,0	Cyclophosphamid	
22,50	164,0950	-1,2	H ⁺	133,6	0,1	Fenuron	Herbizid
25,72	263,1885	0,8	H ⁺	161,1	0,1	Tramadol	Analgetikum
26,19	748,5085	-0,8	H ⁺	263,4	0,1	Azithromycin	Antibiotikum
26,21	325,2253	-1,4	Na ⁺	178,8	0,1	Bisoprolol	Betablocker
	325,2253	1,8	H ⁺	187,8	-0,2	Bisoprolol	
29,71	265,1579	1,9	H ⁺	159,7	0,0	Mirtazapin	Antidepressivum
	253,0521	-3,9	H ⁺	155,1	0,2	Sulfamethoxazol	Antibiotikum
29,72	188,0950	-1,9	Na ⁺	154,8	-0,1	Phenazon	Analgetikum
	188,0950	-2,6	H ⁺	138,8	0,1	Phenazon	
30,21	311,1092	2,2	H ⁺	172,1	0,9	Fenamidon	Fungizid
30,25	133,0640	2,2	H ⁺	125,1	-0,5	4-MBTZ	Korrosionsschutz- mittel
	133,0640	2,2	H ⁺	125,6	-0,1	5-MBTZ	Korrosionsschutz- mittel
37,60	252,0899	-0,8	H ⁺	161,3	-0,1	Carbamazpin- 10,11-Epoxid	Metabolit
37,63	119,0483	2,5	H ⁺	122,1	0,2	BTA	Korrosionsschutz- mittel
38,08	277,2042	1,8	H ⁺	171,4	0,3	Venlafaxin	Antidepressivum
46,74	250,1569	-2,2	Na ⁺	166,9	-0,7	Gemfibrozil	Lipidsenker
46,81	241,1361	2,9	H ⁺	159,4	-0,1	Terbutryn	Herbizid
54,28	295,0627	-2,7	H ⁺	170,8	-1,0	N4-Acetyl- Sulfamethoxazol	Metabolit
58,58	198,1732	-1,5	H ⁺	148,9	0,2	Cycluron	Herbizid

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta\Omega$ [%]	Substanz	Gruppe
58,65	191,1310	1,6	H ⁺	143,2	-0,3	DEET	Insektenschutzmittel
61,25	267,1834	2,2	H ⁺	172,2	0,5	Metoprolol	Betablocker
61,84	269,1416	-1,1	H ⁺	168,7	-0,4	Mepronil	Fungizid
66,23	292,0979	0,7	H ⁺	173,2	0,8	Climbazol	Antimykotikum
66,57	206,1419	0,0	Na ⁺	159,4	0,1	Isoproturon	Herbizid
66,59	733,4612	0,7	H ⁺	257,8	0,6	Erythromycin	Antibiotikum
70,53	747,4769	0,3	H ⁺	266,1	0,2	Clarithromycin	Antibiotikum
74,54	836,5246	-2,6	H ⁺	276,2	0,2	Roxithromycin	Antibiotikum
	836,5246	-1,4	Na ⁺	278,3	-0,1	Roxithromycin	
74,75	230,0943	1,6	Na ⁺	161,3	0,6	Naproxen	Antiphlogistikum
78,15	277,1830	-4,7	H ⁺	167,6	0,9	Amitriptylin	Antidepressivum
78,44	422,1622	2,6	H ⁺	200,8	0,8	Losartan	Blutdrucksenker
78,60	278,0861	-4,7	H ⁺	163,3	0,8	Triphenyl- phosphanoxid	
79,24	270,1620	-2,6	H ⁺	165,5	-0,5	Estron	Östrogen
	270,1620	-2,6	H ⁺	166,3	-0,1	Trenbolon	Anabolikum
81,56	324,1638	-0,6	H ⁺	181,8	0,7	Citalopram	
82,54	440,1597	1,1	H ⁺	196,3	0,5	Candesartan	Herz-Kreislauf- Medikament
82,58	403,1168	1,2	Na ⁺	196,9	0,2	Azoxystrobin	Fungizid
83,01	435,9387	0,7	Na ⁺	195,1	0,3	Fipronil	Insektizid
83,12	295,0167	2,0	H ⁺	159,1	0,6	Diclofenac	Antiphlogistikum
	295,0167	-2,5	Na ⁺	167,5	0,6	Diclofenac	
83,53	376,2000	0,3	H ⁺	187,6	-0,3	Enalapril	Blutdrucksenker
93,83	236,0950	0,0	Na ⁺	161,9	0,4	Carbamazepin	Analgetikum

5.4 Analyse von *Ginkgo biloba* mit GC-APCI-IM-qTOF-MS

Die vorherigen Abschnitte befassen sich ausschließlich mit flüssigchromatographischen Methoden, die bereits eine sehr gute Trennleistung bei der Analyse komplexer Proben bieten. Mit einer solchen Methode sind aber nicht alle Inhaltsstoffe zugänglich. Um möglichst viele Informationen zu einer Probe zu erfassen, ist der Einsatz unterschiedlicher Methoden, z.B. Gaschromatographie (GC) und HPLC, weiterhin sinnvoll. Für die Analyse unpolarer, verdampfbarer Verbindungen werden häufig gaschromatographische Methoden eingesetzt. Vor allem bei komplexen Proben ist

die comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie (GCxGC), gekoppelt mit Massenspektrometrie, mittlerweile ein etabliertes Verfahren [253–255]. Auch wenn bereits einige Anwendungen die Ionenmobilitätsspektrometrie als selektiven Detektor in der GC nutzten [256,257] bzw. den Vorteil vereinfachter IMS Spektren durch einen Gaschromatographen als Einlasssystem erkannten [11,258,259] und GC-IMS Systeme bei der Analyse flüchtiger organischer Verbindungen durchaus schon verwendet wurden [260,261], gibt es bisher nur wenige Anwendungen, die eine zweidimensionale Trennung mit GC-IMS und anschließender Massenspektrometrie als dritter Dimension zeigen [262,263].

In dieser Arbeit wurde die Gaschromatographie über eine chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) mit der Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie gekoppelt. Die kommerziell erhältliche GC-APCI-Quelle wurde zur Verbesserung der Signalqualität und -intensität in unserer Arbeitsgruppe modifiziert (s. 4.1.3). Von der gleichen *Ginkgo biloba* Probe, deren Analyse mit LC+LC-IM-qTOF-MS in 5.3.3 ausführlich dargestellt ist, wurde ein Extrakt in Dichlormethan hergestellt, um unpolare Substanzen mit GC-APCI-IM-qTOF-MS zu erfassen. Die Heatmap dieser Analyse ist in Abbildung 35 dargestellt. Es ist eine gute Auftrennung von vielen Komponenten in beiden Dimensionen (GC und IMS) zu erkennen.

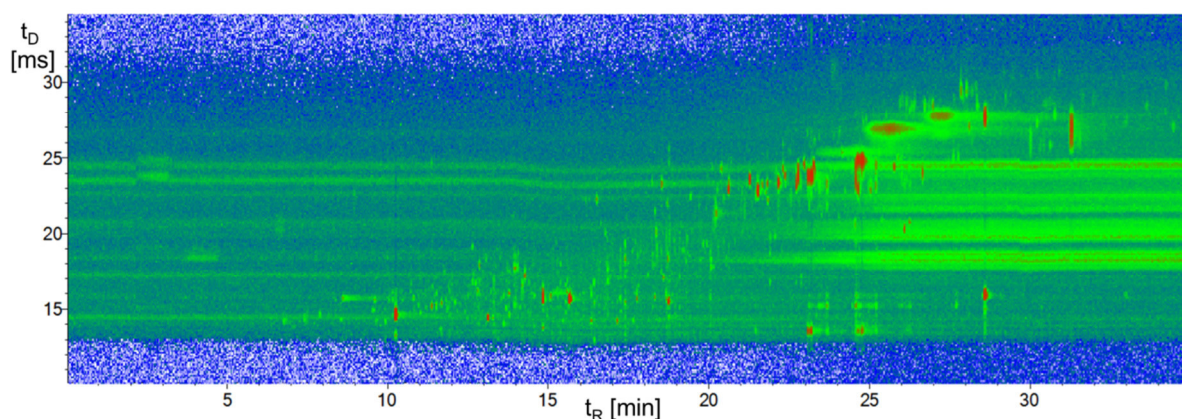


Abbildung 35: Heatmap der GC-IM-qTOF-MS Analyse (APCI pos.) eines Dichlormethan-Extrakts von *Ginkgo biloba*; Methodenparameter in Tabelle 8

Auch hier zeigen einzelne Beispiele die Trennung von isobaren Substanzen mit gleicher Retentionszeit und gleichem m/z -Verhältnis nach ihrer Driftzeit (s. Abbildung 36). Um die CCS-Werte der Analyten bei der GC-Kopplung berechnen zu können,

muss zunächst eine geeignete Kalibration, wie in 5.1.1.2 für die Single-Field Methode beschrieben, entwickelt werden. Die Komponenten des bei HPLC-ESI-Messungen verwendeten Tunemix konnten mit GC-APCI nicht detektiert werden. Daher muss in weiteren Arbeiten eine Mischung gut detektierbarer Substanzen mit ausreichend großen Unterschieden hinsichtlich Masse und Driftzeit erstellt werden, deren CCS zudem sicher bekannt sind. Nach einer Erweiterung der CCS Datenbank um mehr GC relevante Substanzen könnte dann die Feature-Analyse von GC-IM-qTOF-MS Analysen und die anschließende Datenbanksuche nach exakten Massen und CCS ein weiteres wichtiges Werkzeug bei der Charakterisierung komplexer Proben sein. Für eine noch bessere Trennleistung kann zudem die Analyse in vier Dimensionen analog zu 5.3 mit GC+GC-IM-qTOF-MS eingesetzt werden. Anwendbarkeit und Vorteile der GC+GC mit Flammenionisationsdetektion (FID) wurden in unserem Arbeitskreis bereits gezeigt [264].

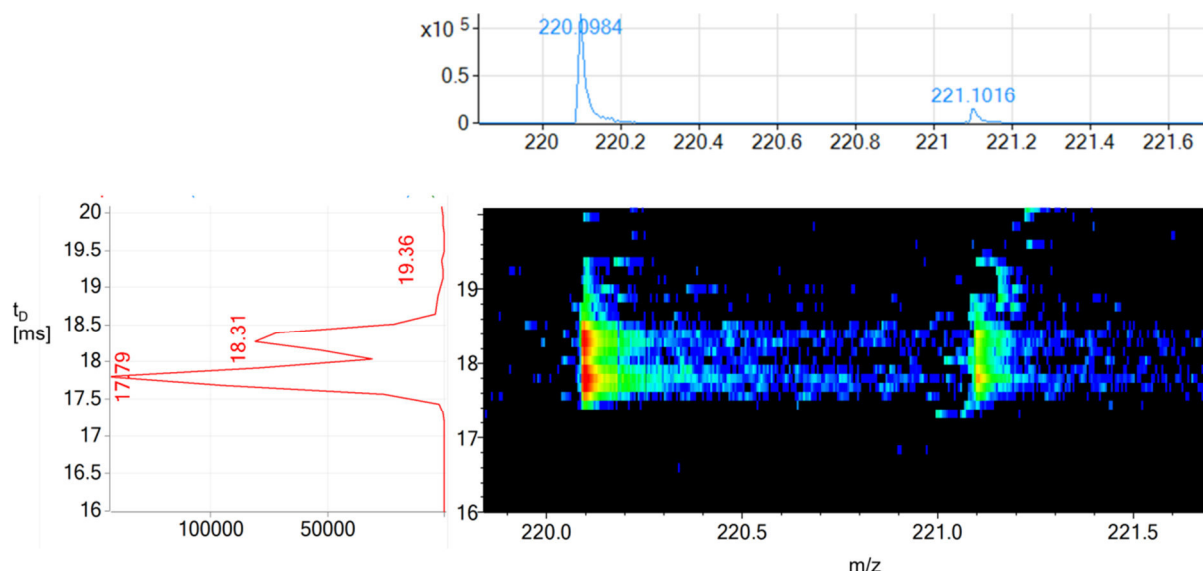


Abbildung 36: Driftspektrum (rot), Massenspektrum (blau) und 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) extrahiert bei $t_R = 20,07$ bis $20,12$ min der GC-IM-qTOF-MS Analyse von *Ginkgo biloba*; zwei coeluiierende Substanzen mit $m/z = 220,0984$ wurden in der IM Dimension getrennt.

5.5 Ausblick

Die CCS Datenbank muss um viele Einträge verschiedener Substanzklassen erweitert werden. Dazu ist die CCS-Bestimmung einer Vielzahl an weiteren Standards oder Mischungen bekannter Zusammensetzung erforderlich. Weiterhin sollten auch Werte für Analyten ergänzt werden, die besser mit der APCI ionisierbar sind. Für Messungen mit GC-APCI-IM-qTOF-MS sollten außerdem geeignete Substanzen gefunden werden, mit denen eine Kalibration für die CCS-Berechnung, analog zu der in dieser Arbeit verwendeten Single-Field Methode, durchgeführt werden kann. Anschließend kann eine Erweiterung der Datenbank hinsichtlich GC relevanter Analyten erfolgen. Neben der CCS-Bestimmung von Standards wäre eine Möglichkeit zur Berechnung von CCS wünschenswert. Da die Berechnung mit bisher erhältlicher Software nicht trivial und zudem nicht für CCS-Werte in Stickstoff möglich ist, sollte hier eine Zusammenarbeit mit Informatikern stattfinden. Eine Optimierung der Trennung einiger isobarer Substanzen könnte durch die Variation des Driftgases, unter anderem auch durch den Einsatz chiraler Gase, erreicht werden. Damit dies technisch möglich ist, ist der Einbau eines zusätzlichen Gaskits in das IM-qTOF-MS-System notwendig. Dieses würde zudem noch die Präzision und Reproduzierbarkeit der CCS-Werte erhöhen.

Zur Unterscheidung von isomeren Lipiden wäre eine Ergänzung der bereits verfügbaren Methoden um MS/MS-Experimente hilfreich. Idealerweise sollten dabei in einem Analysenlauf CCS-Werte ermittelt und MS/MS Fragmentspektren aufgenommen werden, sodass über exakte Masse und CCS die Lipidzusammensetzung und –klasse bestimmt sowie über die Fragmente die Fettsäurezusammensetzung festgestellt werden kann. Für die Trennung von Lipiden sollte ebenfalls eine zweidimensionale chromatographische Methode entwickelt werden, die diese zum Beispiel in der ersten Dimension nach polaren Seitengruppen und in der zweiten Dimension nach Länge der Kohlenstoffketten trennt. Es sollte außerdem an einer Lösung gearbeitet werden, mehrfach modulierte Substanzen automatisch zu erkennen und zu einem Feature-Eintrag zusammenzufassen, sodass auch eine Analyse mit LCxLC-IM-QTOF-MS möglich wird. Die Arbeiten mit der GC-APCI-IM-qTOF-MS sollten fortgesetzt und auch hier eine vierdimensionale Methode als GC+GC-IM-qTOF-MS aufgebaut werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine analytische Trennmethode in vier Dimensionen (2D-LC, IMS und MS) aufgebaut, die zusammen mit einer ebenfalls entwickelten Datenbank für CCS-Werte die non-target Analyse komplexer Proben ermöglicht.

Dazu wurden Methoden zur Bestimmung von CCS mittels IM-qTOF-MS untersucht und auf ihre Reproduzierbarkeit hin überprüft. CCS-Werte unterschiedlicher Adduktionen von mehr als 500 Standardsubstanzen wurden anschließend gemessen und in eine Datenbanksoftware eingetragen. Zusätzlich wurden CCS-Werte von Lipiden unterschiedlicher Klassen aus einer komplexen Mischung ermittelt. Des Weiteren wurde anhand einiger Beispiele untersucht, inwieweit isobare Substanzen mittels IM-qTOF-MS getrennt und anhand ihrer CCS-Werte unterschieden werden können. Dabei wurde festgestellt, dass bei einigen Konstitutionsisomeren eine Trennung gut möglich ist, gerade bei kleineren Molekülen die Unterschiede in der räumlichen Struktur zum Teil aber nicht ausreichend sind, um eine genügend große Differenz der Driftzeiten im IMS zu erreichen. Es zeigte sich zudem, dass die Trennung von Isobaren auch vom betrachteten Adduktion abhängig ist. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Analysen verschiedener Realproben mit HPLC-IM-qTOF-MS durchgeführt. Dabei konnte am Beispiel von Zitronensaft gezeigt werden, dass coeluerende, isobare Substanzen in der IM-Dimension eine Auftrennung erfahren und dass bei Peaks mit gleichen exakten Massen die CCS-Werte zu einer sichereren Identifizierung beitragen. Somit können mehr Informationen gewonnen werden als mit herkömmlichen HPLC-MS Messungen. Anhand der Analyse von Orangensaftproben wurde die Anwendung der Hauptkomponentenanalyse auf die komplexen Datensätze gezeigt, die die Unterscheidung von Proben zwei verschiedener Gruppen ermöglicht. Der Nutzen der zuvor erstellten CCS Datenbank für die Identifizierung von Komponenten einer Probe konnte anhand eines Pflanzenextrakts aus *Castanea sativa* und zwei lipidhaltigen Realproben demonstriert werden. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit eine zweidimensionale HPLC-Methode entwickelt (LC+LC), die an das vorhandene IM-qTOF-MS-System gekoppelt werden kann. Dabei konnte über eine lange Modulationszeit von vier Minuten erreicht werden, dass Analyten nicht oder höchstens einmal moduliert werden und dadurch eine visuelle Darstellung und Datenauswertung mit aktuell verfügbarer Software möglich ist. Die entwickelte vierdimensionale Methode (LC+LC-IM-qTOF-MS) wies eine gute Reproduzierbarkeit hinsichtlich Retentions-

zeiten und Peakflächenverhältnissen auf und erreichte eine Peakkapazität von über 8000. Anhand der Analyse einer Abwasserprobe konnte die hohe Trennleistung der Methode und die Anwendbarkeit der CCS Datenbank für die non-target-Analyse gezeigt werden. Dabei konnten, aufgrund der verbesserten Trennung nach der Analyse mit LC+LC-IM-qTOF-MS, deutlich mehr Substanzen identifiziert werden als in der gleichen Probe nach einer HPLC-IM-qTOF-MS Messung. Abschließend wurde eine GC-APCI-IM-qTOF-MS Kopplung realisiert und am Beispiel eines Pflanzenextrakts von *Ginkgo biloba* demonstriert, dass auch hier die IMS als zusätzliche Trenndimension in einer Analyse mehr Informationen über eine Probe liefern kann.

7 Anhang

Tabelle 21: CCS-Werte für das $[M+H]^+$ - und das $[M+Na]^+$ -Addukt von Colchicin aus zehn unabhängigen Messungen

Messung	$[M+H]^+$			$[M+Na]^+$		
	Ω [\AA^2]	s [\AA^2]	RSD vom	Ω [\AA^2]	s [\AA^2]	RSD vom
			Mittelwert [%]			Mittelwert [%]
1	196,2	0,26	0,30	202,3	0,26	0,05
2	196,9	0,25	0,06	202,4	0,25	0,01
3	196,5	0,27	0,15	202,3	0,29	0,05
4	196,8	0,25	0,01	202,6	0,23	0,09
5	197,1	0,24	0,16	202,9	0,24	0,24
6	196,7	0,29	0,05	201,8	0,32	0,30
7	196,5	0,29	0,15	202,1	0,30	0,15
8	196,7	0,26	0,05	202,2	0,27	0,10
9	197,5	0,29	0,36	202,9	0,27	0,24
10	197,0	0,25	0,11	202,6	0,28	0,09
Mittelwert	196,8	0,27		202,4	0,28	

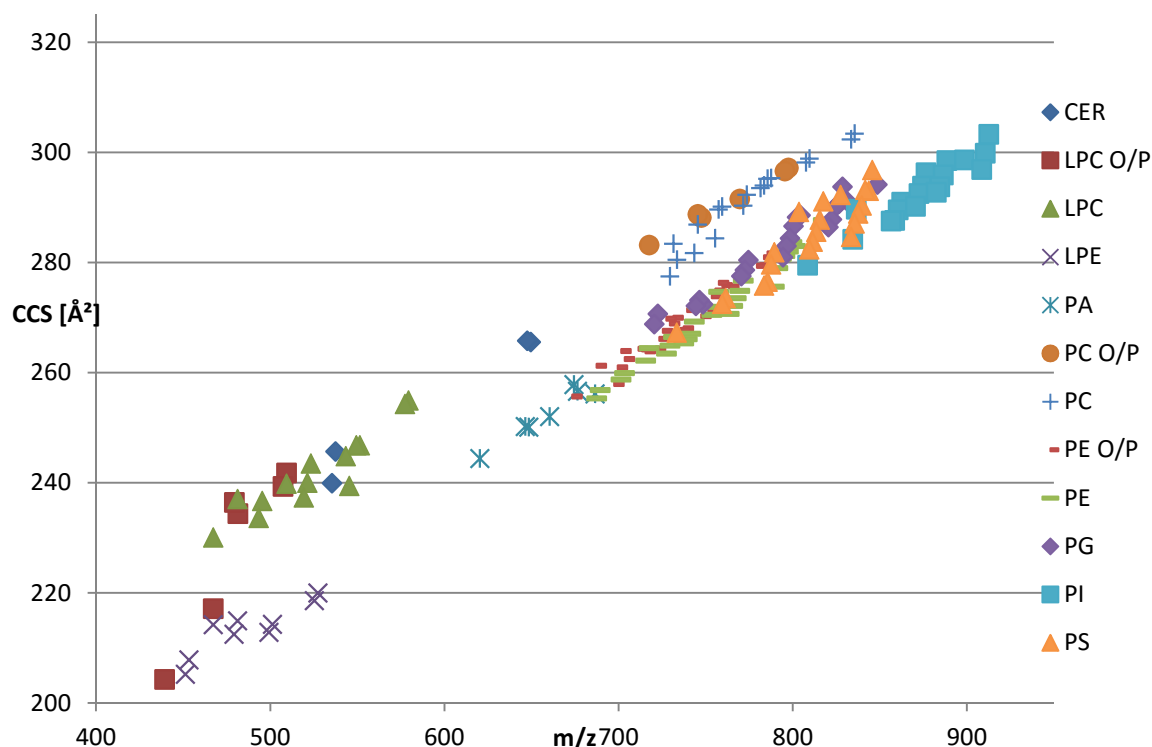
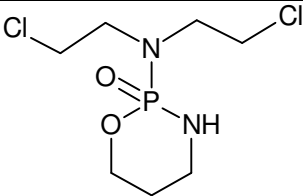
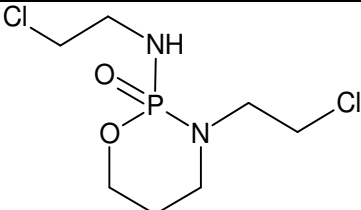
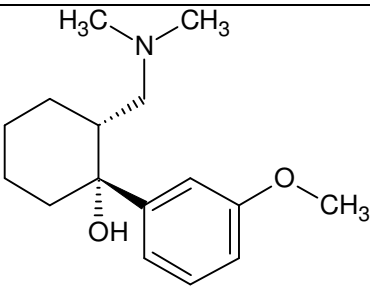
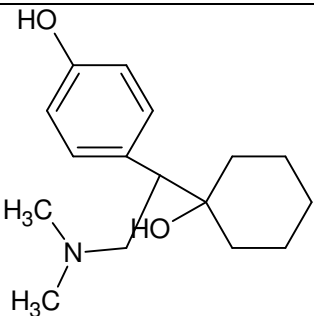
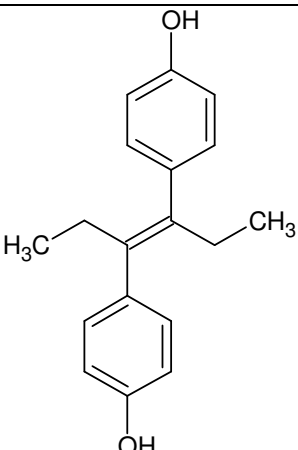
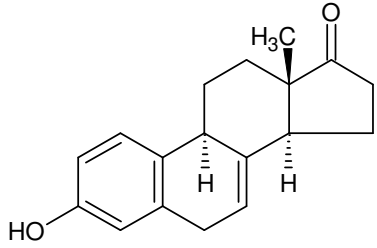
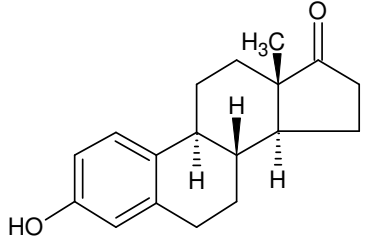
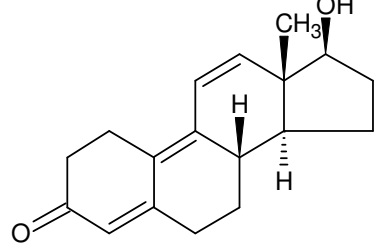
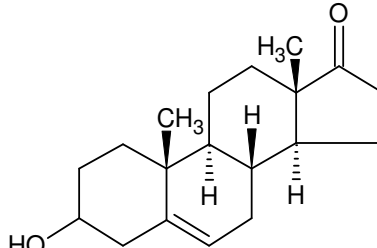
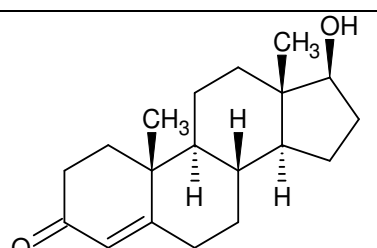
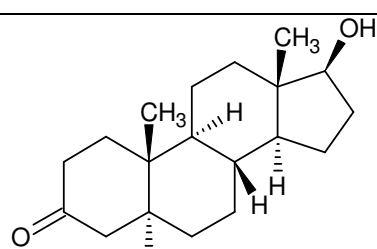


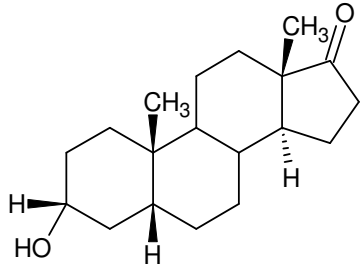
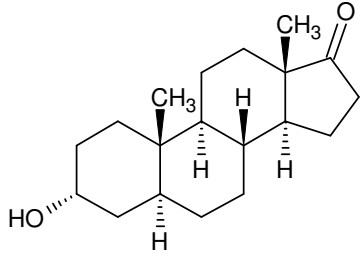
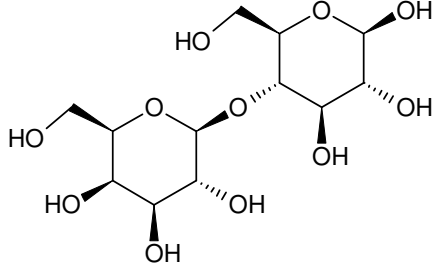
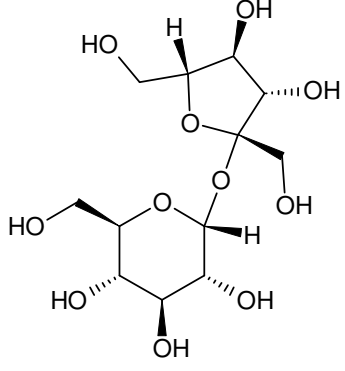
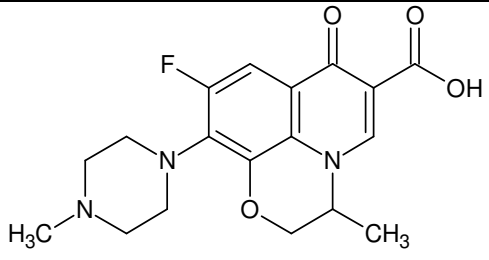
Abbildung 37: Plot von CCS gegen m/z der bestimmten Lipide im negativen ESI Modus; CER: Ceramide, LPC: Lyso-Phosphatidylcholin, LPC O/P: LPC mit Alkylethersubstituent, LPE: Lyso-Phosphatidylethanolamin, PA: Diacylglycerophosphate, PC: Phosphatidylcholine, PC O/P: Plasmanylcholine, PE: Phosphatidylethanolamine, PE O/P: Plasmanylethanolamine, PG: Glycerophosphoglycerol, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserine

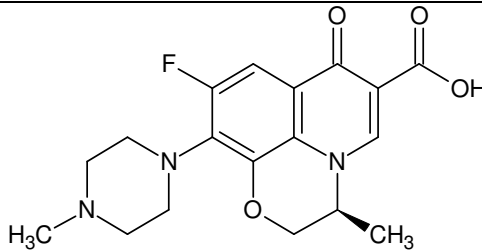
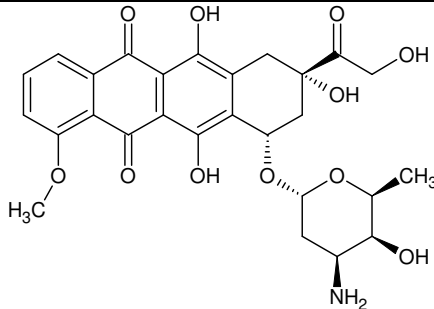
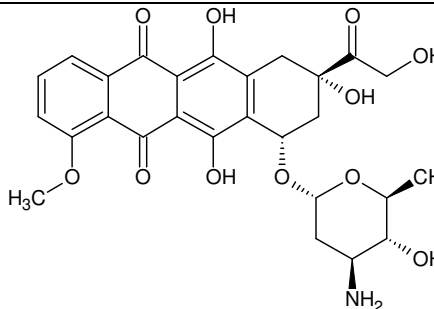
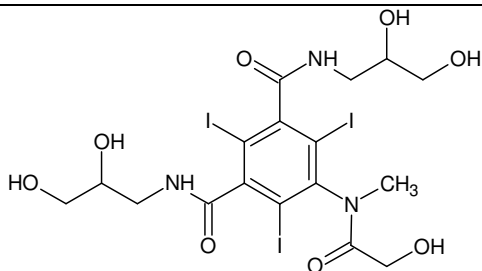
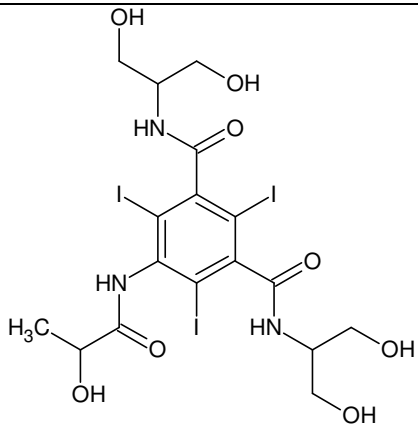
Tabelle 22: Summenformeln und Strukturformeln der in 5.1.2 untersuchten isobaren Substanzpaare

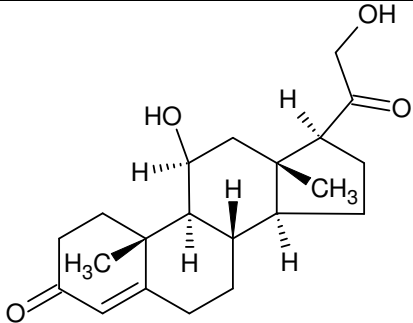
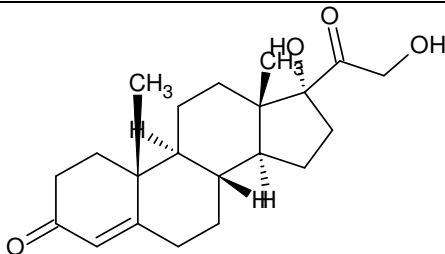
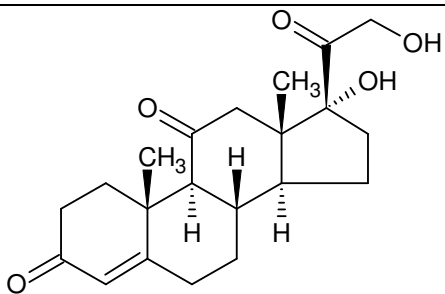
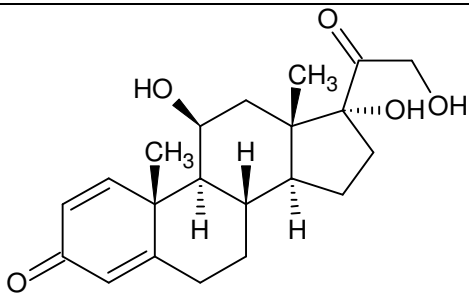
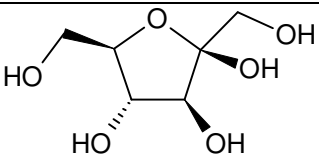
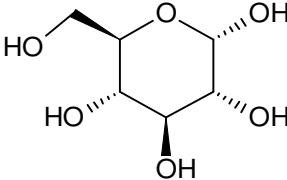
Name	Exakte Masse [Da]	Summenformel	Strukturformel
5-Methyl-Benzotriazol	133,0640	$C_7H_7N_3$	
4-Methyl-Benzotriazol	133,0640	$C_7H_7N_3$	

Name	Exakte Masse [Da]	Summenformel	Strukturformel
Cyclophosphamid	260,0248	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	
Ifosfamid	260,0248	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	
Tramadol	263,1885	$C_{16}H_{25}NO_2$	
Desvenlafaxin	263,1885	$C_{16}H_{25}NO_2$	
Diethylstilbestrol	268,1463	$C_{18}H_{20}O_2$	

Name	Exakte Masse [Da]	Summenformel	Strukturformel
Equilin	268,1463	$C_{18}H_{20}O_2$	
Estron	270,1620	$C_{18}H_{22}O_2$	
Trenbolon	270,1620	$C_{18}H_{22}O_2$	
Dehydroepiandrosteron	288,2089	$C_{19}H_{28}O_2$	
Testosteron	288,2089	$C_{19}H_{28}O_2$	
Dihydrotestosteron	290,2246	$C_{19}H_{30}O_2$	

Name	Exakte Masse [Da]	Summenformel	Strukturformel
Etiocholanon	290,2246	$C_{19}H_{30}O_2$	
Androsteron	290,2246	$C_{19}H_{30}O_2$	
Lactose	342,1162	$C_{12}H_{22}O_{11}$	
Sucrose	342,1162	$C_{12}H_{22}O_{11}$	
Ofloxacin	361,1438	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	

Name	Exakte Masse [Da]	Summenformel	Strukturformel
Levofloxazin	361,1438	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	
Doxorubicin	543,1741	$C_{27}H_{29}NO_{11}$	
Epirubicin	543,1741	$C_{27}H_{29}NO_{11}$	
Iomeprol	776,8541	$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$	
Iopamidol	776,8541	$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$	

Name	Exakte Masse [Da]	Summenformel	Strukturformel
Corticosteron	346,2144	$C_{21}H_{30}O_4$	
Cortexolon	346,2144	$C_{21}H_{30}O_4$	
Cortison	360,1937	$C_{21}H_{28}O_5$	
Prednisolon	360,1937	$C_{21}H_{28}O_5$	
Fructose	180,0634	$C_6H_{12}O_6$	
Glucose	180,0634	$C_6H_{12}O_6$	

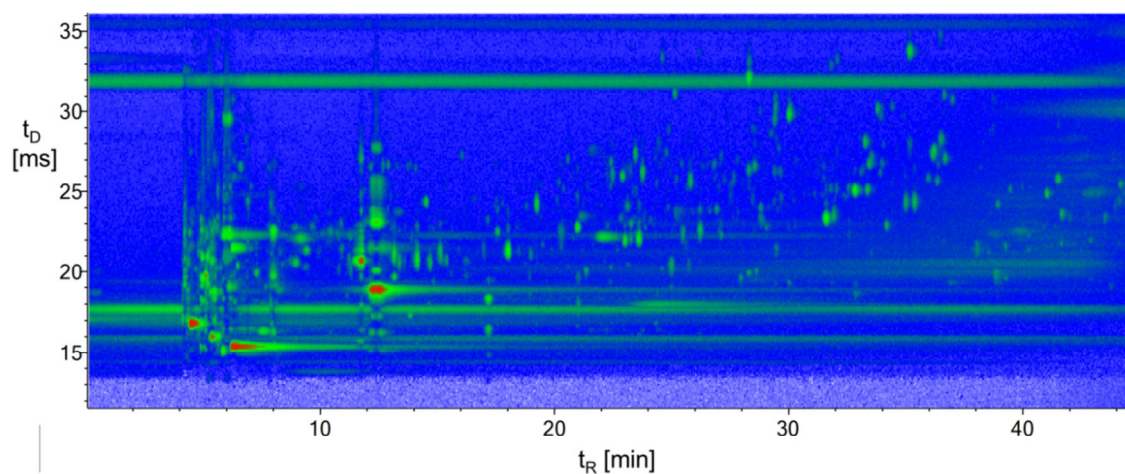


Abbildung 38: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) einer Orangensaftprobe (Direktsaft); Methodenparameter in Tabelle 3

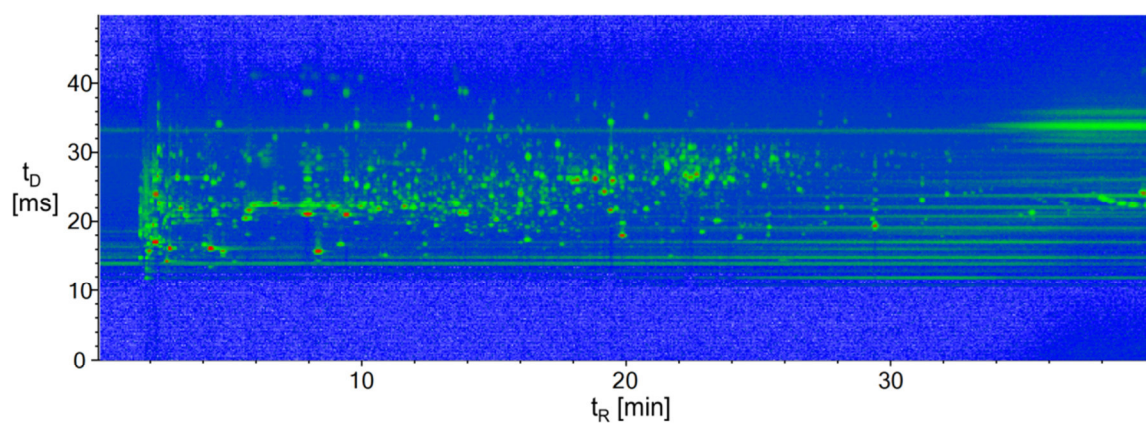


Abbildung 39: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI neg.) eines wässrigen Extrakts von *Castanea sativa*; Methodenparameter in Tabelle 4

Tabelle 23: Ergebnisse der Feature-Suche der Messungen Nr. 1-3 von *Castanea sativa* inklusive Häufigkeiten (ergänzend zu Tabelle 16); alle Substanzen wurden als [M-H]⁻-Ionen beobachtet und bei der Datenbanksuche mit einer Toleranz von $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ % gefunden

	Datenbankeintrag		Gefundenes Feature in der HPLC-IM-qTOF-MS Analyse							
Substanz	m/z	Ω [Å ²]	Nr	m/z	$\Delta m/z$ [ppm]	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	t _R [min]	t _D [ms]	Intensität
Theophyllin	179,0574	134,3	1	179,0569	2,8	133,2	0,8	1,86	16,50	26532
			2	179,0572	1,1	133,0	1,0	1,86	16,48	33573
			3	179,0574	0,0	133,3	0,7	1,85	16,52	35048
Ascorbinsäure	175,0248	130,1	1	175,0245	1,7	130,0	0,1	4,58	16,07	518029
			2	175,0245	1,7	130,1	0,0	4,57	16,08	499404
			3	175,0247	0,6	130,3	-0,2	4,46	16,11	483829
Catechin	289,0717	159,9	1	289,0724	-2,4	158,8	0,7	15,21	20,25	1100401
			2	289,0720	-1,0	158,7	0,8	15,20	20,25	1044406
			3	289,0723	-2,1	159,1	0,5	15,11	20,29	1005205
Rutin	609,1461	236,1	1	609,1472	-1,8	234,4	0,7	22,48	30,73	917845
			2	609,1468	-1,1	234,4	0,7	22,47	30,73	862272
			3	609,1473	-2,0	234,8	0,6	22,45	30,78	727490

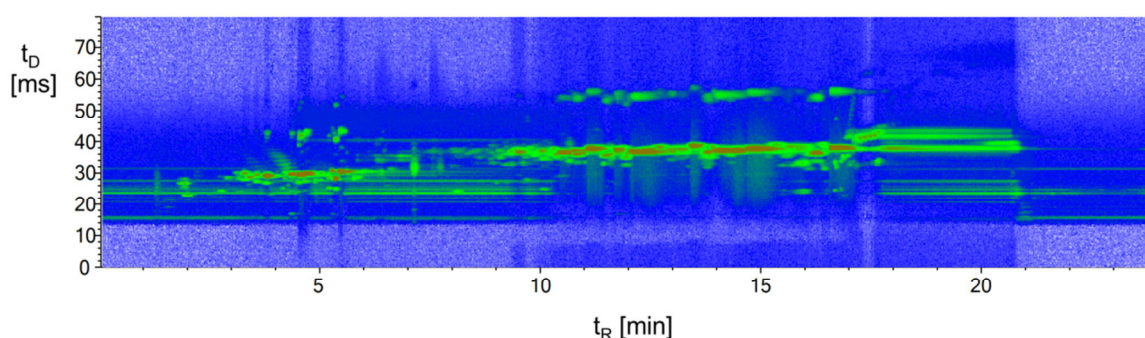


Abbildung 40: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) eines Eigelbextraktes; Methodenparameter in Tabelle 5

Tabelle 24: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) von Lipiden aus Eigelb mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert

Lipid	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	t_R [min]
LPC (O/P) 15:0	467,3376	0,6	H ⁺	223,8	0,1	5,92
LPC (O/P) 16:0	481,3532	1,9	H ⁺	228,7	-0,4	5,11
LPC (O/P) 16:1	479,3376	-0,6	H ⁺	224,9	0,0	5,00
LPC 14:0	467,3012	0,4	H ⁺	219,2	-0,5	3,22
LPC 15:0	481,3168	0,6	H ⁺	222,7	-0,7	4,00
LPC 15:0	481,3168	1,7	H ⁺	222,7	-0,3	5,25
LPC 15:0	481,3168	-0,6	H ⁺	222,7	0,8	5,41
LPE 18:0	481,3168	3,1	H ⁺	218,6	-0,8	6,04
LPE 18:0	481,3168	1,5	H ⁺	218,6	-0,8	6,31
LPE 18:0	481,3168	3,7	H ⁺	218,6	-0,2	6,65
PA 34:2	672,4730	-1,7	NH ₄ ⁺	264,7	-0,3	11,69
PA 35:2	686,4887	-0,6	NH ₄ ⁺	273,3	0,1	10,20
PA 36:2	700,5043	-1,8	NH ₄ ⁺	271,4	-0,3	13,93
PA 36:3	698,4887	-1,8	NH ₄ ⁺	267,6	-0,4	11,74
PA 38:4	724,5043	-2,0	NH ₄ ⁺	271,5	-0,9	12,12
PA 38:5	722,4887	-0,9	NH ₄ ⁺	273,2	0,8	10,43
PA 38:5	722,4887	-1,9	NH ₄ ⁺	273,2	-0,7	11,59
PA 38:6	720,4730	0,7	NH ₄ ⁺	269,4	0,1	9,16

Anhang

Lipid	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	t_R [min]
PA 38:6	720,4730	-0,1	NH ₄ ⁺	269,4	-0,4	9,74
PA 38:6	720,4730	-0,3	NH ₄ ⁺	269,4	-0,8	10,20
PE (O/P) 34:1	703,5516	-2,1	H ⁺	271,6	-0,5	15,70
PE (O/P) 34:2	701,5359	-2,3	H ⁺	273,4	-0,1	15,27
PE (O/P) 34:2	701,5359	-2,3	H ⁺	273,4	-0,1	15,27
PE (O/P) 34:3	699,5203	-1,4	H ⁺	270,4	0,5	13,32
PE 34:2	715,5152	-1,8	H ⁺	267,7	-0,3	11,74
PE 37:2	757,5622	-2,2	H ⁺	283,0	-0,4	12,45
PI 36:4	858,5258	0,2	H ⁺	294,9	-0,5	8,99
PI 38:4	886,5571	-1,7	H ⁺	300,5	-0,9	10,75
PI 40:7	908,5415	0,9	H ⁺	301,3	-0,5	10,73
SM 34:0	704,5832	-2,3	H ⁺	283,6	-0,6	12,95
SM 34:1	702,5676	-2,4	H ⁺	281,6	-0,2	11,90
SM 34:2	700,5519	-0,6	H ⁺	279,7	0,0	10,26
TAG 50:4	826,7050	-0,8	NH ₄ ⁺	311,3	0,8	17,18
TAG 51:3	842,7363	-1,6	NH ₄ ⁺	316,3	0,4	17,31
TAG 53:3	870,7676	-0,1	NH ₄ ⁺	323,1	0,2	17,41
TAG 54:5	880,7520	3,0	NH ₄ ⁺	323,1	0,4	17,28
TAG 54:6	878,7363	2,6	NH ₄ ⁺	321,6	0,7	17,20
TAG 56:2	914,8302	-3,4	NH ₄ ⁺	334,1	-0,2	17,69
TAG 56:3	912,8146	-2,8	NH ₄ ⁺	332,9	0,1	17,59
TAG 56:5	908,7833	-0,9	NH ₄ ⁺	330,2	0,1	17,42
TAG 56:6	906,7676	1,1	NH ₄ ⁺	328,6	0,2	17,31
TAG 56:7	904,7520	-0,1	NH ₄ ⁺	326,7	0,0	17,25
TAG 58:2	942,8615	-1,9	NH ₄ ⁺	339,3	0,1	17,79

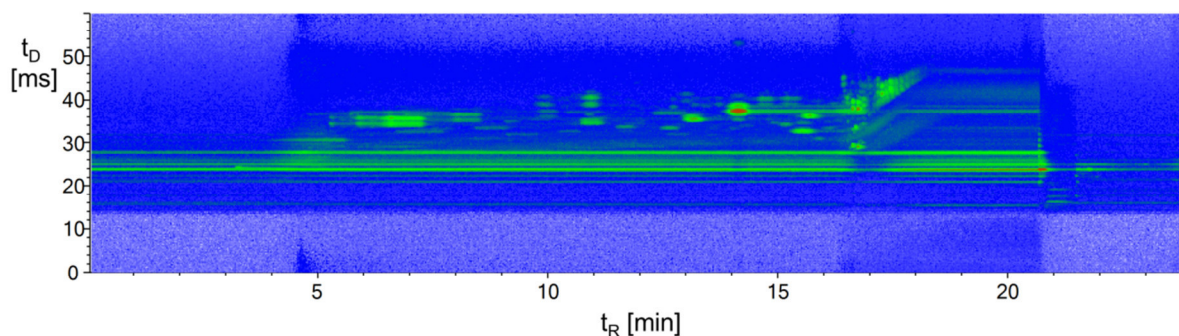


Abbildung 41: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) eines Olivenöls; Methodenparameter in Tabelle 5

Tabelle 25: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos) von Lipiden aus Olivenöl mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert

Lipid	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	t_R [min]
TAG 52:4	854,7363	-2,3	NH ₄ ⁺	318,2	0,7	17,29
TAG 54:3	884,7833	-3,2	NH ₄ ⁺	326,4	0,5	17,47
TAG 52:3	856,7520	-1,9	NH ₄ ⁺	319,7	0,4	17,38
TAG 54:4	882,7676	-3,0	NH ₄ ⁺	324,6	0,6	17,38
TAG 50:2	830,7363	-3,7	NH ₄ ⁺	315,2	0,2	17,40
TAG 48:1	804,7207	-2,9	NH ₄ ⁺	310,9	0,2	17,39
TAG 48:2	802,7050	-3,4	NH ₄ ⁺	309,8	0,5	17,31
TAG 54:5	880,7520	-1,6	NH ₄ ⁺	323,1	0,8	17,28
TAG 49:2	816,7207	-3,4	NH ₄ ⁺	312,3	0,2	17,35
TAG 46:2	774,6737	-3,3	NH ₄ ⁺	302,8	0,3	17,21
TAG 51:2	844,7520	-2,5	NH ₄ ⁺	318,8	-0,8	17,31
TAG 47:2	788,6894	-3,3	NH ₄ ⁺	306,4	0,5	17,25
TAG 49:2	816,7207	-2,3	NH ₄ ⁺	312,3	-0,7	17,21
TAG 44:1	748,6581	-3,3	NH ₄ ⁺	300,2	0,9	17,20
TAG 50:2	830,7363	-2,7	NH ₄ ⁺	315,2	-0,9	17,24
TAG 50:3	828,7207	-2,8	NH ₄ ⁺	313,2	0,1	17,31

Lipid	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	t_R [min]
TAG 48:3	800,6894	-3,4	NH ₄ ⁺	309,4	1,0	17,22
TAG 56:2	914,8302	-4,0	NH ₄ ⁺	334,1	-0,4	17,52
TAG 53:3	870,7676	-2,5	NH ₄ ⁺	323,1	-0,8	17,32
TAG 58:2	942,8615	-4,6	NH ₄ ⁺	339,3	0,5	17,81
TAG 51:3	842,7363	-3,5	NH ₄ ⁺	316,3	-0,9	17,22
TAG 51:3	842,7363	-3,3	NH ₄ ⁺	316,3	0,0	17,36
TAG 58:3	940,8459	-3,7	NH ₄ ⁺	338,3	-0,5	17,49

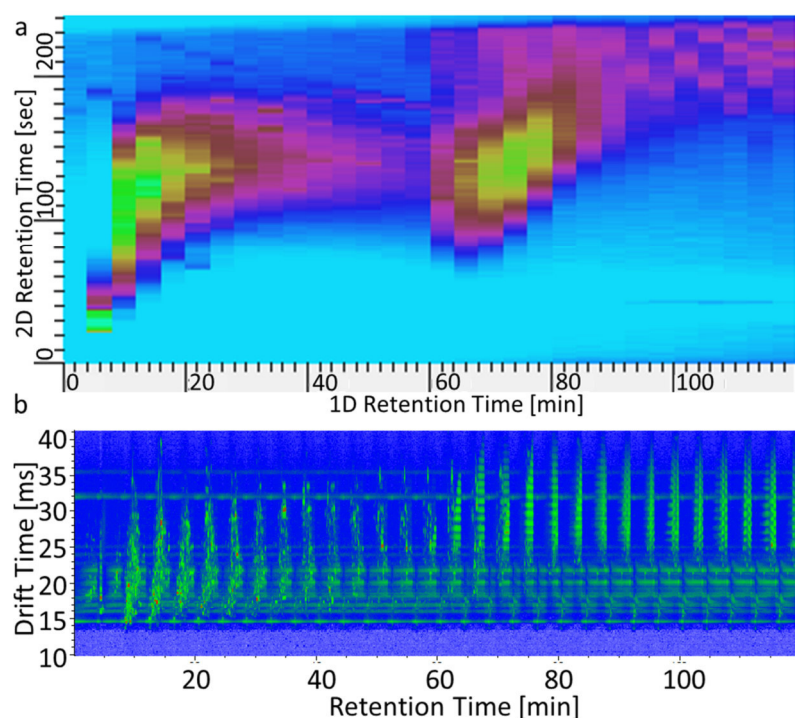


Abbildung 42: a) Contour plot nach Blanksubstraktion und b) Heatmap einer LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos) von Kaffee; Methodenparameter in Tabelle 7

Tabelle 26: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse von Kaffee mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. *Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, könnte zusätzlich ein Abgleich der Retentionszeiten mit Standards erfolgen.

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	Summen- formel	Substanz
8,73	123,0320	0,0	H ⁺	125,5	-0,2	C ₆ H ₅ NO ₂	Niacin
9,31	180,0647	0,0	H ⁺	138,4	0,4	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	Theophyllin
21,72	188,0950	1,6	H ⁺	138,8	-0,6	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	Phenazon*
21,94	188,0950	-1,1	H ⁺	138,8	0,2	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	Phenazon*
25,49	238,1106	-2,5	H ⁺	151,4	-0,3	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O	10,11-Dihydrocarbamazepin*
25,61	194,0804	0,0	H ⁺	140,9	0,1	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	Koffein
25,61	194,0804	4,1	Na ⁺	160,5	-0,6	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	Koffein
25,88	229,1094	-3,0	H ⁺	153,3	0,6	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	Terbuthylazin*
58,45	188,0950	0,0	H ⁺	138,8	-0,9	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	Phenazon*

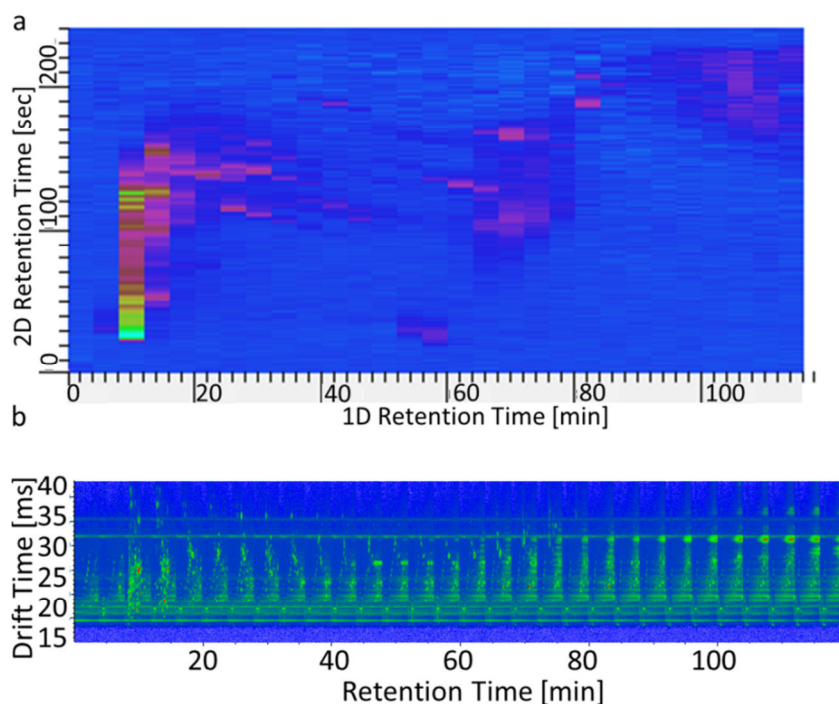


Abbildung 43: a) Contour plot nach Blanksubstraktion und b) Heatmap einer LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) eines wässrigen Extrakts von *Castanea sativa* Blättern; Methodenparameter in Tabelle 7

Tabelle 27: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse des wässrigen *Castanea sativa* Extrakts mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. Aufgrund des sehr ähnlichen m/z und CCS-Wertes kann hier bei dem Peak bei 8,48 Minuten nicht zwischen Glucose und Theophyllin unterschieden werden. Ein Vergleich mit Kaffee in Tabelle 26 zeigt Theophyllin bei einer Retentionszeit von 9,31 Minuten. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich hier um Glucose handelt.

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	Summenformel	Substanz
8,48	180,0634	-3,0	Na ⁺	147,7	-0,7	C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose
8,48	180,0647	3,4	Na ⁺	148,0	-0,5	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	Theophyllin
8,51	180,0634	0,5	Na ⁺	142,3	0,1	C ₆ H ₁₂ O ₆	Fructose
8,82	131,0946	2,3	H ⁺	136,1	0,8	C ₆ H ₁₃ NO ₂	Leucin
8,82	131,0946	2,3	H ⁺	134,4	-0,4	C ₆ H ₁₃ NO ₂	Isoleucin
8,83	181,0739	3,8	H ⁺	146,8	0,4	C ₉ H ₁₁ NO ₃	Tyrosin
13,56	290,0790	-4,5	Na ⁺	181,2	0,4	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catechin
13,56	290,0790	0,3	H ⁺	169,5	0,5	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catechin

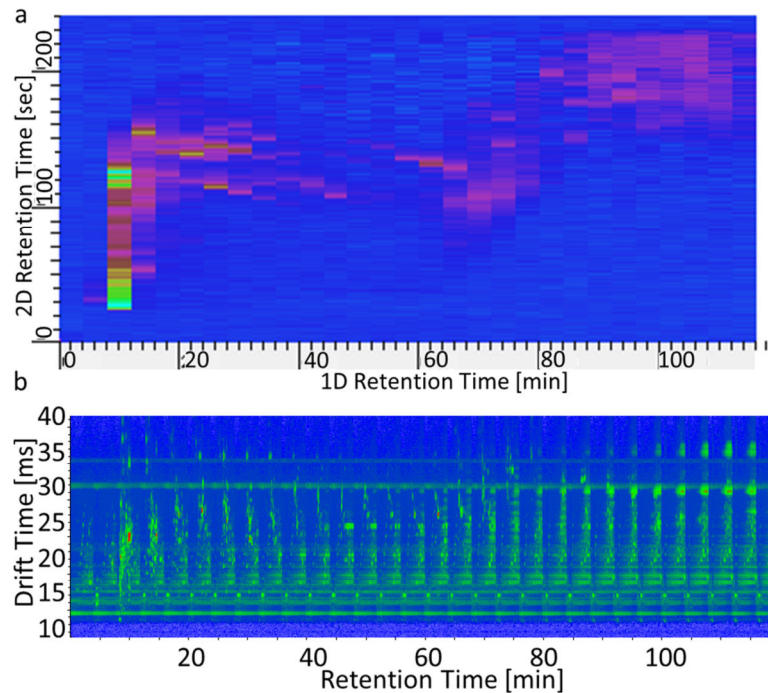


Abbildung 44: a) Contour plot nach Blanksubstraktion und b) Heatmap einer LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse eines methanolischen Extrakts von *Castanea sativa* Blättern; Methodenparameter in Tabelle 7

Tabelle 28: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) des methanolischen *Castanea sativa* Extrakts mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. Aufgrund des sehr ähnlichen m/z und CCS-Wertes kann hier bei dem Peak bei 8,48 Minuten nicht zwischen Glucose und Theophyllin unterschieden werden. Ein Vergleich mit Kaffee in Tabelle 26 zeigt Theophyllin bei einer Retentionszeit von 9,31 Minuten. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich hier um Glucose handelt.

t_R [min]	Exakte Masse [Da]	$\Delta m/z$ [ppm]	Addukt	Ω [Å ²]	$\Delta \Omega$ [%]	Summenformel	Substanz
8,48	180,0634	-1,5	Na ⁺	147,7	0,1	C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose
8,48	180,0647	4,9	Na ⁺	148,0	0,3	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	Theophyllin
8,52	180,0634	-0,5	Na ⁺	142,3	0,9	C ₆ H ₁₂ O ₆	Fructose
13,56	290,0790	-3,5	Na ⁺	181,2	0,7	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catechin
13,56	290,0790	0,3	H ⁺	169,5	0,8	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catechin
22,52	610,1534	-2,6	H ⁺	234,4	0,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin
22,52	610,1534	-0,9	Na ⁺	249,4	0,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin
26,45	610,1534	-2,6	H ⁺	234,4	0,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der DTIMS. An den Ringelektroden liegt ein linearer Spannungsgradient an. Die Analytionen werden in einer Trap gesammelt und durch das Gitter in Paketen in die Driftröhre entlassen. Die Trennung findet aufgrund von Ladung, Größe und Gestalt der Ionen durch Stöße mit den Driftgasmolekülen statt.	4
Abbildung 2: Prinzip der TWIMS. An benachbarten Ringelektroden liegt eine entgegengesetzte Wechselspannung (RF) an. Ein Gleichspannungspuls (DC) wandert mit der Zeit (Zeitpunkte t_0 , t_1 , t_2) über die einzelnen Ringelektroden. Ionen mit geringer Mobilität bleiben dabei hinter diesen Spannungspulsen zurück, während Ionen mit höherer Mobilität sich mit dieser „Welle“ bewegen.	7
Abbildung 3: Prinzip der FAIMS. An den beiden Elektroden liegt eine hochfrequente, unsymmetrische Spannung (DV) an, so dass sich abwechselnd unterschiedlich starke elektrische Felder ausbilden. An der unteren Elektrode liegt zusätzlich eine Gleichspannung zur Kompensation (CV) an. Die Ionen werden nach ihrer feldabhängigen Mobilität getrennt und gelangen nur bei einer bestimmten Spannung CV zwischen den Elektroden hindurch zum Detektor.	9
Abbildung 4: Aufbau eines IM-qTOF-MS Instruments (mit Genehmigung von Agilent Technologies [54]).	11
Abbildung 5: a) Chromatogramm mit Totzeit (t_M), Retentionszeiten von zwei Substanzen (t_R) sowie deren reduzierten Retentionszeiten (t'_R). b) Idealer gaußförmiger Peak mit Standardabweichung (σ), Peakbassissbreite (w_b) und Peakbreite auf halber Höhe (FWHM).	16
Abbildung 6: Van-Deemter Kurve der Bodenhöhe H in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit u (schwarz), zusammengesetzt aus den Termen der Eddy-Diffusion (A , rot), der Längsdiffusion (B/u , blau) und des Massenaustauschterms ($C \cdot u$, grün). Die geringste Bodenhöhe H_{min} wird bei der optimalen Fließgeschwindigkeit u_{opt} erreicht.	18
Abbildung 7: Trennung mit der Heart-cutting LC in der ersten Dimension (links) und weitere Trennung der ausgeschnittenen Fraktion auf der zweiten Dimension (rechts)	21
Abbildung 8: 2-Pos/4-Port-Ventil für die LCxLC; links: Das Eluat der 1. Dimension wird in der 1. Schleife gesammelt; rechts: Die in der 1. Schleife gesammelte Fraktion wird auf die 2. Säule injiziert und dort getrennt, während die nächste Fraktion von der 1. Dimension in der 2. Schleife gesammelt wird.	21
Abbildung 9: Darstellung der LCxLC Trennung in einem Contourplot.	22
Abbildung 10: Effekt des Undersamplings auf die 2D-LC Auflösung: Werden je Peak aus der ersten Dimension 4 Fraktionen gesammelt (Sammelzeit $t_S = 2\sigma$), so bleibt die Auflösung der ersten Dimension erhalten und es sind drei Spots zu erkennen (oben links). Mit längerer Sammelzeit und dadurch weniger Fraktionen je Peak geht Auflösung verloren. Bei nur einer Fraktion je Peak (Sammelzeit $t_S = 8\sigma$, entspricht der Peakbreite) werden die drei Komponenten nur noch durch einen Spot abgebildet. Modifiziert nach [184].	24
Abbildung 11: a) Linearer Gradient der ersten Dimension (rot) und Shift Gradient der zweiten Dimension (blau) bei der LC+LC-Methode. b) Einzelner Gradient über 4 Minuten in der zweiten Dimension während der ersten Modulation im Detail.	40
Abbildung 12: Aufbau der modifizierten GC-APCI-Ionenquelle mit zusätzlichem Stickstoffstrom.	40

Abbildung 13: Plot von t_{ges} gegen $1/\Delta V$ für ein Ion mit $m/z = 922,0107$; t_0 ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden.....	46
Abbildung 14: Strukturformel von Colchicin	48
Abbildung 15: CCS-Werte für das $[M+H]^+$ -Addukt von Colchicin aus zehn unabhängigen Messungen	48
Abbildung 16: Plot von CCS gegen m/z der bestimmten Lipide im positiven ESI Modus; CER: Ceramide, DG: Diglyceride, PA: Diacylglycerophosphate, PG: Glycerophosphoglycerol, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserine, SM: Sphingomyeline, TAG: Triglyceride.....	53
Abbildung 17: Plot von CCS gegen m/z der bestimmten Lipide im positiven ESI Modus; Ausschnitt im Bereich der Triglyceride (TAG).....	54
Abbildung 18: Kalibrationsgerade für CCS Messungen nach der Single-Field Methode. β wird aus der Steigung und t_{Fix} aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden bestimmt.....	56
Abbildung 19: Vergleich von CCS ausgewählter Standards nach der Stepped-Field Methode (Mittelwert aus acht CCS-Werten mit Fehlerbalken) und der Single-Field Methode (Einfachbestimmung).....	57
Abbildung 20: Strukturformeln von Glucose und Fructose (a) bzw. Lactose und Saccharose (b) sowie das Driftspektrum (rot), das Massenspektrum (blau) und ein 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) von einer Mischung der jeweiligen Substanzpaare bei $E = 18,1 \text{ V/cm}$	63
Abbildung 21: Driftspektrum (rot), Massenspektrum (blau) und ein 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) von einer Mischung aus sechs Peptiden mit gleicher Aminosäurezusammensetzung, aber teilweise anderer Reihenfolge der Verknüpfung bei $E = 18,1 \text{ V/cm}$	64
Abbildung 22: Ansicht der CCS - Datenbanksoftware mit importierter Feature Liste („feature identification list“; links) und Ergebnissen der Datenbanksuche („identified features“; rechts) bei einer Toleranz von $\Delta m/z = \pm 5 \text{ ppm}$ und $\Delta \Omega = \pm 1 \%$	67
Abbildung 23: a) Totalionenchromatogramm (TIC, ESI pos.) einer HPLC-IM-qTOF-MS Analyse von Zitronensaft und b) entsprechende Heatmap aus Driftzeit t_D gegen Retentionszeit t_R ; Methodenparameter in Tabelle 3.....	68
Abbildung 24: a) Driftspektrum (rot), Massenspektrum (blau) und 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) extrahiert bei $t_R=29,9\text{-}30,2 \text{ min}$ b) Strukturformel von Hesperidin c) Strukturformel von Neohesperidin	70
Abbildung 25: Extrahiertes Ionenchromatogramm des $[M+H]^+$ -Adduktions von Rutin ($m/z = 611,1607$) der HPLC-IM-qTOF-MS Analyse von Zitronensaft (Bedingungen wie in Abbildung 23).....	71
Abbildung 26: Scores-Plot der Hauptkomponentenanalyse von Orangensäften.....	74
Abbildung 27: Loadings-Plot der Hauptkomponentenanalyse von Orangensäften	75
Abbildung 28: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI neg.) eines Eigelbextraktes; Methodenparameter in Tabelle 5.....	80
Abbildung 29: Schema der Trennung in vier Dimensionen bei der LC+LC-IM-qTOF-MS.....	83
Abbildung 30: Aufbau des LC+LC-Systems. Das Eluat der ersten Dimension ($100 \mu\text{L/min}$) wird kontinuierlich mit Wasser ($300 \mu\text{L/min}$) verdünnt. Hinter der Mischkammer wird mit einem Fluss von	

380 $\mu\text{L}/\text{min}$ über ein T-Stück abgesaugt, sodass die Probenschleifen mit verdünntem Eluat (20 $\mu\text{L}/\text{min}$) gefüllt werden.	85
Abbildung 31: Contourplot der LC+LC-qTOF Analyse von Ginkgo biloba (TIC nach Blanksubstraktion). Die gestrichelten Linien markieren die Fläche A_{eff} für die Berechnung der Peakkapazität in 5.3.3.2... 86	86
Abbildung 32: a) Heatmap der LC+LC-IM-qTOF-MSAnalyse (ESI pos.) eines Ginkgo biloba Extrakts. b) Ausschnitt der Heatmap mit Trennung einer Fraktion (gesammelt zwischen 4 und 8 Minuten) in der zweiten Dimension (Elution von der zweiten Säule zwischen 8 und 12 Minuten). c) Driftspektrum (rot), Massenspektrum (blau) und 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) extrahiert bei $t_R=9,63$ bis $9,76$ min. d) Ein vergrößerter Ausschnitt zeigt die Trennung von zwei Peaks mit dem gleichen m/z -Verhältnis in der IM Dimension. Methodenparameter in Tabelle 7.	88
Abbildung 33: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) von Abwasser; Methodenparameter in Tabelle 6	94
Abbildung 34: a) Heatmap der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) von Abwasser b) Ausschnitt der Heatmap mit Trennung einer Fraktion (gesammelt zwischen 16 und 20 Minuten) in der zweiten Dimension (Elution von der zweiten Säule zwischen 20 und 24 Minuten); Methodenparameter in Tabelle 7	96
Abbildung 35: Heatmap der GC-IM-qTOF-MS Analyse (APCI pos.) eines Dichlormethan-Extrakts von Ginkgo biloba; Methodenparameter in Tabelle 8	100
Abbildung 36: Driftspektrum (rot), Massenspektrum (blau) und 2D-Plot (m/z gegen Driftzeit) extrahiert bei $t_R = 20,07$ bis $20,12$ min der GC-IM-qTOF-MS Analyse von Ginkgo biloba; zwei coeluerende Substanzen mit $m/z = 220,0984$ wurden in der IM Dimension getrennt.	101
Abbildung 37: Plot von CCS gegen m/z der bestimmten Lipide im negativen ESI Modus; CER: Ceramide, LPC: Lyso-Phosphatidylcholin, LPC O/P: LPC mit Alkylethersubstituent, LPE: Lyso-Phosphatidylethanolamin, PA: Diacylglycerophosphate, PC: Phosphatidylcholine, PC O/P: Plasmalylcholine, PE: Phosphatidylethanolamine, PE O/P: Plasmalylethanolamine, PG: Glycerophosphoglycerol, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserine	106
Abbildung 38: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) einer Orangensaftprobe (Direktsaft); Methodenparameter in Tabelle 3.....	112
Abbildung 39: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI neg.) eines wässrigen Extrakts von Castanea sativa; Methodenparameter in Tabelle 4	112
Abbildung 40: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) eines Eigelbextraktes; Methodenparameter in Tabelle 5.....	114
Abbildung 41: Heatmap der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) eines Olivenöls; Methodenparameter in Tabelle 5	116
Abbildung 42: a) Contour plot nach Blanksubstraktion und b) Heatmap einer LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos) von Kaffee; Methodenparameter in Tabelle 7	118
Abbildung 43: a) Contour plot nach Blanksubstraktion und b) Heatmap einer LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) eines wässrigen Extrakts von Castanea sativa Blättern; Methodenparameter in Tabelle 7	119

Abbildung 44: a) Contour plot nach Blanksubstraktion und b) Heatmap einer LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse eines methanolischen Extrakts von *Castanea sativa* Blättern; Methodenparameter in Tabelle 7..... 120

7.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Häufig eingesetzte funktionelle Gruppen bei modifizierten stationären Phasen.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 2: Methodenparameter zur CCS-Messung von Einzelstandards mit der Stepped-Field Methode.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 3: Methodenparameter zur LC-IM-qTOF-MS Analyse von Fruchtsäften</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 4: Methodenparameter zur LC-IM-qTOF-MS Analyse von Castanea sativa.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 5: Methodenparameter zur LC-IM-qTOF-MS Analyse von lipidhaltigen Proben.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 6: Methodenparameter zur LC-IM-qTOF-MS Analyse von Abwasser.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 7: Methodenparameter zur LC+LC-IM-qTOF-MS-Analyse verschiedener Realproben</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 8: Methodenparameter zur GC-IM-qTOF-MS-Analyse von Ginkgo biloba</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 9: Vergleich der CCS (Ω) von Colchicin berechnet nach der Stepped-Field Methode über verschiedene Kombinationen an Driftspannungen und Vergleich mit der Literatur</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 10: Ermittelte CCS-Werte für ausgewählte Substanzen und Vergleich mit Literaturwerten</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 11: Strukturen der untersuchten Lipidklassen</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 12: Unterscheidbarkeit ausgewählter Isobarenpaare (K: Konstitutionsisomere, D: Diastereomere, E: Enantiomere) im IMS mit N₂ als Driftgas; die Auflösung R zwischen zwei Driftpeaks wurde aus der Driftzeit t_D und der Peakbreite auf halber Höhe FWHM berechnet; die CCS mit Standardabweichung s wurde für jede Substanz einzeln bestimmt und die absolute sowie die relative Differenz zwischen zwei Isobaren ermittelt</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 13: CCS von sechs isobaren Peptiden mit gleicher Aminosäurezusammensetzung. Für die [M+H]⁺-Addukte ist jeweils der relative Unterschied zwischen zwei von der Größe her aufeinanderfolgenden Peptiden angegeben.</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 14: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der HPLC-IM-qTOF-MS Analyse von Zitronensaft mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert</i>	<i>72</i>
<i>Tabelle 15: Charakteristische Feature der Hauptkomponentenanalyse von Orangensäften</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 16: Ergebnisse der Feature-Suche der Messungen Nr. 1-3 von Castanea sativa; alle Substanzen wurden als [M-H]⁻-Ionen beobachtet und bei der Datenbanksuche mit einer Toleranz von $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ % gefunden</i>	<i>78</i>
<i>Tabelle 17: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI neg.) von Lipiden aus Eigelb mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 18: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse von Ginkgo biloba mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 19: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-qTOF-MS Analyse von Abwasser mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. Zusätzlich ist angegeben, zu welcher Gruppe von Kontaminanten die Substanz zählt.</i>	<i>94</i>

Tabelle 20: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse von Abwasser mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. Zusätzlich ist angegeben zu welcher Gruppe von Kontaminanten die Substanz zählt.	97
Tabelle 21: CCS-Werte für das $[M+H]^+$ - und das $[M+Na]^+$ -Addukt von Colchicin aus zehn unabhängigen Messungen	105
Tabelle 22: Summenformeln und Strukturformeln der in 5.1.2 untersuchten isobaren Substanzpaare	106
Tabelle 23: Ergebnisse der Feature-Suche der Messungen Nr. 1-3 von <i>Castanea sativa</i> inklusive Häufigkeiten (ergänzend zu Tabelle 16); alle Substanzen wurden als $[M-H]^-$ -Ionen beobachtet und bei der Datenbanksuche mit einer Toleranz von $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ % gefunden.	113
Tabelle 24: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) von Lipiden aus Eigelb mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert.	114
Tabelle 25: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos) von Lipiden aus Olivenöl mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert	116
Tabelle 26: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse von Kaffee mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. *Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, könnte zusätzlich ein Abgleich der Retentionszeiten mit Standards erfolgen.	118
Tabelle 27: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse des wässrigen <i>Castanea sativa</i> Extrakts mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. Aufgrund des sehr ähnlichen m/z und CCS-Wertes kann hier bei dem Peak bei 8,48 Minuten nicht zwischen Glucose und Theophyllin unterschieden werden. Ein Vergleich mit Kaffee in Tabelle 26 zeigt Theophyllin bei einer Retentionszeit von 9,31 Minuten. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich hier um Glucose handelt.	119
Tabelle 28: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC+LC-IM-qTOF-MS Analyse (ESI pos.) des methanolischen <i>Castanea sativa</i> Extrakts mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und Ω entsprechen dem Datenbankwert. Aufgrund des sehr ähnlichen m/z und CCS-Wertes kann hier bei dem Peak bei 8,48 Minuten nicht zwischen Glucose und Theophyllin unterschieden werden. Ein Vergleich mit Kaffee in Tabelle 26 zeigt Theophyllin bei einer Retentionszeit von 9,31 Minuten. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich hier um Glucose handelt.	120

8 Literatur

- [1] M.S. Curie, Rayons émis par les composés de l'uranium et du thorium, *Comptes Rendus*. 126 (1898) 1101–1103.
- [2] E. Rutherford, The Discharge of Electrification by Ultra-violet Light, *Proc. Camb. Philos.* 9 (1898) 401–416.
- [3] E. Rutherford, The Velocity and Rate of Recombination of the Ions of Gases exposed to Röntgen Radiation, *Philos. Mag.* 44 (1897) 422–440.
- [4] P. Langevin, L'Ionisation des gaz, *Ann. Chim. Phys.* 28 (1903) 289–384.
- [5] P. Langevin, Une Formule Fondamentale de Théorie Cinétique, *Ann. Chim. Phys.* (1905) 245–288.
- [6] A.M. Tyndall, The mobility of positive ions in gases, *Cambridge Phys. Tracts*, Cambridge Univ. Press. (1938).
- [7] R.J. van de Graaff, The Mobility of Ions in Gases, *Nature*. 124 (1929) 10–11. doi:10.1038/124010b0.
- [8] G.A. Eiceman, Z. Karpas, H.H.J. Hill, Ion mobility spectrometry, 3rd Aufl., CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Ranton, FL, 2014.
- [9] Carroll, Cohen, Wernlund, Apparatus and Methods for Separating, Detecting and Measuring Trace Gases with enhanced Resolution, Patentnr. 3.626.180, 1968.
- [10] Cohen, Detecting a Trace Substance in a Sample Gas Comprising Reacting the Sample with Different Species of Reactant Ions, Patentnr. 3.621.239, 1969.
- [11] G.A. Eiceman, Ion-mobility spectrometry as a fast monitor of chemical composition, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 259–275. doi:10.1016/S0165-9936(02)00406-5.
- [12] I. Marquez-Sillero, E. Aguilera-Herrador, S. Cardenas, M. Valcarcel, Ion-mobility spectrometry for environmental analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 677–690. doi:10.1016/j.trac.2010.12.007.
- [13] S. Armenta, M. Alcalá, M. Blanco, A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry (IMS), *Anal. Chim. Acta*. 703 (2011) 114–123. doi:10.1016/j.aca.2011.07.021.
- [14] A. Kuklya, F. Uteschil, K. Kerpen, R. Marks, U. Telgheder, Development of an electrospray-63Ni-differential ion mobility spectrometer for the analysis of aqueous samples, *Talanta*. 120 (2014) 173–180. doi:10.1016/j.talanta.2013.10.056.
- [15] M. Mäkinen, M. Nousiainen, M. Sillanpää, Ion Spectrometric detection technologies for Ultra-Trace explosives: a review, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 987–992. doi:10.1002/mas.
- [16] M. Tam, H.H. Hill, Secondary electrospray ionization-ion mobility spectrometry

- for explosive vapor detection, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2741–2747. doi:10.1021/ac0354591.
- [17] R. Ewing, A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds, *Talanta*. 54 (2001) 515–529. doi:10.1016/S0039-9140(00)00565-8.
- [18] M.A. Mäkinen, O.A. Anttalainen, T. Sillanpää, Mika E, Ion mobility spectrometry and its applications in detection of chemical warfare agents, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9594–600. doi:10.1021/ac100931n.
- [19] W.S. Barnes, D.W. Martin, E.W. McDaniel, Mass spectrographic identification of the ion observed in hydrogen mobility experiments, *Phys. Rev. Lett.* 54 (1985) 735–738.
- [20] K.B. McAfee, D. Edelson, Identification and Mobility of Ions in a Townsend Discharge by Time-Resolved Mass Spectrometry, *Proc. Phys. Soc.* 382 (1962) 382–384. doi:10.1088/0370-1328/81/2/125.
- [21] C.H. Bloomfield, J.B. Hasted, New Technique for the Study of Ion-Atom Interchange, *Discuss. Faraday Soc.* 37 (1964) 176–184.
- [22] W. Jiang, R.A.S. Robinson, Ion Mobility-Mass Spectrometry, in: *Encycl. Anal. Chem.*, John Wiley & Sons, 2013: S. 10815–10837. doi:10.1002/9780470027318.
- [23] A. Schumann, Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit der Ionenmobilitätsspektrometrie als Detektionsverfahren für flüchtige Thermolyseprodukte bei der Entstehung von Bränden, Mercator-Universität-Duisburg, 2001.
- [24] J. Zeleny, On the ratio of the velocities of the two ions produced in gases by Röntgen radiation; and on some related phenomena, *Philos. Mag. Ser. 5.* 46 (1898) 120–154. doi:10.1080/14786449808621173.
- [25] L.B. Loeb, Formation of negative Ions in Air, *Phys. Rev. Lett.* 17 (1921) 89–115.
- [26] A.M. Tyndall, C.F. Powell, Mobility of Positive Ions in Helium, *Proc. R. Soc. London, Ser. A.* 134 (1931) 125–136. doi:10.1098/rspa.1983.0054.
- [27] N.E. Bradbury, Electron Attachment and Negative Ion Formation in Oxygen and Oxygen Mixtures, *Phys. Rev. Lett.* 44 (1933) 883–890.
- [28] J.C. May, J. a. McLean, Ion mobility-mass spectrometry: time-dispersive instrumentation, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1422–1436. doi:10.1021/ac504720m.
- [29] J. Xu, W.B. Whitten, J.M. Ramsey, A Miniature Ion Mobility Spectrometer, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 5 (2008) 207–214.
- [30] S.I. Merenbloom, S.L. Koeniger, S.J. Valentine, M.D. Plasencia, D.E. Clemmer, IMS-IMS and IMS-IMS-IMS / MS for Separating Peptide and Protein Fragment Ions, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2802–2809. doi:10.1021/ac052208e.

- [31] E.S. Baker, B.H. Clowers, F. Li, K. Tang, A. V. Tolmachev, D.C. Prior, u. a., Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry Performance Using Electrodynamic Ion Funnel and Elevated Drift Gas Pressures, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1176–1187. doi:10.1016/j.jasms.2007.03.031.
- [32] C. Laphorn, F. Pullen, B.Z. Chowdhry, Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions, *Mass Spectrom. Rev.* 32 (2013) 43–71. doi:10.1002/mas.
- [33] E.A. Mason, E.W. McDaniel, Transport properties of ions in gases, 1. Aufl., John Wiley & Sons, New York, 1988.
- [34] D.E. Clemmer, M.F. Jarrold, Ion mobility measurements and their applications to clusters and biomolecules, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 577–592. doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199706)32:6<577::AID-JMS530>3.0.CO;2-4.
- [35] G. Von Helden, M.T. Bowers, T. Wyttenbach, Inclusion of a MALDI ion source in the ion chromatography technique: conformational information on polymer and biomolecular ions, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 147 (1995) 349–364.
- [36] L.G. McKnight, K.B. McAfee, D.P. Sipler, Low-field drift velocities and reactions of nitrogen ions in nitrogen, *Phys. Rev.* 164 (1967) 62–70. doi:10.1103/PhysRev.164.62.
- [37] P. Dwivedi, B. Bendiak, B.H. Clowers, H.H. Hill, Rapid Resolution of Carbohydrate Isomers by Electrospray Ionization Ambient Pressure Ion Mobility Spectrometry-Time-of-Flight Mass Spectrometry (ESI-APIMS-TOFMS), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1163–1175. doi:10.1016/j.jasms.2007.04.007.
- [38] K.B. McAfee, D. Sipler, D. Edelson, Mobilities and reactions of ions in Argon, *Phys. Rev.* 160 (1967) 130–135. doi:10.1103/PhysRev.160.130.
- [39] G. Asbury, H. Hill, Using different drift gases to change separation factors (α) in ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 580–4. doi:10.1021/ac9908952.
- [40] M. Fasciotti, G.B. Sanvido, V.G. Santos, P.M. Lalli, M. McCullagh, G.F. De Sá, u. a., Separation of isomeric disaccharides by traveling wave ion mobility mass spectrometry using CO₂ as drift gas, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 1643–1647. doi:10.1002/jms.3089.
- [41] W.E. Steiner, B.H. Clowers, P.E. Haigh, H.H. Hill, Secondary Ionization of Chemical Warfare Agent Simulants: Atmospheric Pressure Ion Mobility Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6068–6076. doi:10.1021/ac034349r.
- [42] P. Dwivedi, C. Wu, L.M. Matz, B.H. Clowers, W.F. Siems, H.H. Hill Jr., Gas-phase chiral separations by ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8200–8206. doi:10.1021/ac0608772.

- [43] S.J. Valentine, S.L. Koeniger, D.E. Clemmer, B. Genomics, B.H. Road, V.H.J.A.C. Soc, A Split-Field Drift Tube for Separation and Efficient Fragmentation of Biomolecular Ions field region for ion separation and a high-field region for, 75 (2003) 6202–6208.
- [44] N.E. Bradbury, R.A. Nielsen, Absolute values of the electron mobility in hydrogen, *Phys. Rev.* 49 (1936) 388–393. doi:10.1103/PhysRev.49.388.
- [45] P. Dwivedi, P. Wu, S.J. Klopsch, G.J. Puzon, L. Xun, H.H. Hill, Metabolic profiling by Ion Mobility Mass Spectrometry (IMMS), *Metabolomics*. 4 (2008) 63–80. doi:10.1007/s11306-007-0093-z.
- [46] Y.S. Liu, S.J. Valentine, A.E. Counterman, C.S. Hoaglund, D.E. Clemmer, Injected-ion mobility analysis of biomolecules, *Anal. Chem.* 69 (1997) A728–A735.
- [47] P.R. Kemper, N.F. Dupuis, M.T. Bowers, A new, higher resolution, ion mobility mass spectrometer, *Int. J. Mass Spectrom.* 287 (2009) 46–57. doi:10.1016/j.ijms.2009.01.012.
- [48] T. Wytenbach, P.R. Kemper, M.T. Bowers, Design of a new electrospray ion mobility mass spectrometer, *Int. J. Mass Spectrom.* 212 (2001) 13–23. doi:10.1016/S1387-3806(01)00517-6.
- [49] M.F. Jarrold, Drift tube studies of atomic clusters, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 11–21. doi:10.1021/j100001a004.
- [50] M.F. Jarrold, J.E. Bower, K. Creegan, Chemistry of semiconductor clusters: a study of the reactions of size selected silicon monopositive cluster ions (Si_n^+) ($n = 3\text{--}24$) with ethylene using selected ion drift tube techniques, *J.Chem.Phys.* 90 (1989) 3615–3628. doi:10.1063/1.455820.
- [51] D. Wittmer, Y.H. Chen, B.K. Luckenbill, H.H. Hill, Electrospray Ionization Ion Mobility Spectrometry, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2348–2355. doi:10.1021/ac00086a021.
- [52] X. Tang, J.E. Bruce, H.H.J. Hill, Design and performance of an atmospheric pressure ion mobility Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1115–1122. doi:10.1002/rcm.
- [53] M.J. Cohen, F.W. Karasek, Plasma Chromatography - A New Dimension for Gas Chromatography and Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 8 (1970) 330–337. doi:10.1093/chromsci/8.6.330.
- [54] R. Kurulugama, K. Imatani, The Agilent Ion Mobility Q-TOF Mass Spectrometer System, Technical overview by Agilent Technologies, (2013).
- [55] W.F. Siems, C. Wu, E.E. Tarver, H.H.J. Hill, P.R. Larsen, D.G. McMinn, Measuring the Resolving Power of Ion Mobility Spectrometers, *Anal. Chem.* 66 (1994) 4195–4201. doi:10.1021/ac00095a014.
- [56] H.E. Revercomb, E.A. Mason, Theory of Plasma Chromatography/Gaseous

- Electrophoresis- A Review, *Anal. Chem.* 47 (1975) 970–983. doi:10.1021/ac60357a043.
- [57] A.B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H.H.J. Hill, Ion mobility – mass spectrometry, *J. mass Spectrom.* 43 (2008) 1–22. doi:10.1002/jms.
- [58] Y.M. Ibrahim, E.S. Baker, W.F. Danielson, R. V. Norheim, D.C. Prior, G.A. Anderson, u. a., Development of a new ion mobility (quadrupole) time-of-flight mass spectrometer, *Int. J. Mass Spectrom.* 377 (2014) 655–662. doi:10.1016/j.ijms.2014.07.034.
- [59] S.I. Merenbloom, R.S. Glaskin, Z.B. Henson, D.E. Clemmer, High-Resolution Ion Cyclotron Mobility Spectrometry High-Resolution Ion Cyclotron Mobility Spectrometry, 81 (2009) 1482–1487. doi:10.1021/ac801880a.
- [60] E.J. Davis, K.F. Grows, W.F. Siems, H.H. Hill, Improved ion mobility resolving power with increased buffer gas pressure, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4858–4865. doi:10.1021/ac300452j.
- [61] C. Wu, W.F. Siems, H.H. Hill, Separation of Isomeric Peptides Using Electrospray Ionization / High-Resolution Ion Mobility Spectrometry, 72 (2000) 870–874.
- [62] P. Dugourd, R.R. Hudgins, D.E. Clemmer, M.F. Jarrold, High-resolution ion mobility measurements, *Rev. Sci. Instrum.* 68 (1997) 1122–1129.
- [63] B.H. Clowers, W.F. Siems, H.H. Hill, S.M. Massick, Hadamard transform ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 44–51. doi:10.1021/ac050615k.
- [64] M. Kwasnik, J. Caramore, F.M. Fernandez, Digitally-Multiplexed Nanoelectrospray Ionization Atmospheric Pressure Drift Tube Ion Mobility Spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1587–1594.
- [65] B.H. Clowers, W.F. Siems, Z. Yu, A.L. Davis, A two-phase approach to Fourier transform ion mobility time-of-flight mass spectrometry, *Analyst.* 140 (2015) 6862–6870. doi:10.1039/c5an00941c.
- [66] Y. Hong, W. Niu, H. Gao, L. Xia, C. Huang, C. Shen, u. a., Rapid identification of false peaks in the spectrum of Hadamard transform ion mobility spectrometry with inverse gating technique, *RSC Adv.* 5 (2015) 56103–56109. doi:10.1039/C5RA10245F.
- [67] M. Belov, R.D. Smith, Multiplexed ion mobility spectrometry - time-of-flight mass spectrometry, *Am. Soc. Mass Spectrom.* 79 (2007) 2451–2462.
- [68] D. Gerlich, Inhomogeneous RF Fields: A Versatile Tool for the Study of Processes with Slow Ions, in *Advances in Chemical Physics: State-Selected and State-To-State Ion-Molecule Reaction Dynamics, Part 1. Experiment*, John Wiley & Sons, New York, 1992. doi:10.1002/9780470141397.ch1.
- [69] A.A. Shvartsburg, R.D. Smith, Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9689–9699. doi:10.1021/ac8016295.

- [70] D.P. Smith, T.W. Knapman, I. Campuzano, R.W. Malham, J.T. Berryman, S.E. Radford, u. a., Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies, *Eur. J. Mass Spectrom.* (Chichester, Eng). 15 (2009) 113–30. doi:10.1255/ejms.947.
- [71] K. Giles, S.D. Pringle, K.R. Worthington, D. Little, J.L. Wildgoose, R.H. Bateman, Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2401–2414. doi:10.1002/rcm.1641.
- [72] S.D. Pringle, K. Giles, J.L. Wildgoose, J.P. Williams, S.E. Slade, K. Thalassinou, u. a., An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument, *Int. J. Mass Spectrom.* 261 (2007) 1–12. doi:10.1016/j.ijms.2006.07.021.
- [73] K. Giles, J.P. Williams, I. Campuzano, Enhancements in travelling wave ion mobility resolution, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 1559–1566. doi:10.1002/rcm.5013.
- [74] Y. Zhong, S.-J. Hyung, B.T. Ruotolo, Characterizing the resolution and accuracy of a second-generation traveling-wave ion mobility separator for biomolecular ions, *Analyst.* 136 (2011) 3534–41. doi:10.1039/c0an00987c.
- [75] K.J. Gillig, B.T. Ruotolo, E.G. Stone, D.H. Russell, An electrostatic focusing ion guide for ion mobility-mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 239 (2004) 43–49. doi:10.1016/j.ijms.2004.09.005.
- [76] B.T. Ruotolo, J.L.P. Benesch, A.M. Sandercock, S.-J. Hyung, C. V Robinson, Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1139–1152. doi:10.1038/nprot.2008.78.
- [77] G. Paglia, J.P. Williams, L.C. Menikarachchi, J.W. Thompson, R. Tyldesley-Worster, S. Halldórsson, u. a., Ion mobility-derived collision cross-sections to support metabolomics applications, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3985–3993. doi:10.1021/ac500405x.
- [78] G. Paglia, P. Angel, J.P. Williams, K. Richardson, H.J. Olivos, J.W. Thompson, u. a., Ion mobility-derived collision cross section as an additional measure for lipid fingerprinting and identification, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1137–1144. doi:10.1021/ac503715v.
- [79] C.B. Lietz, Q. Yu, L. Li, Large-scale collision cross-section profiling on a traveling wave ion mobility mass spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25 (2014) 2009–19. doi:10.1007/s13361-014-0920-1.
- [80] M.F. Bush, I.D.G. Campuzano, C. V. Robinson, Ion mobility mass spectrometry of peptide ions: Effects of drift gas and calibration strategies, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7124–7130. doi:10.1021/ac3014498.
- [81] M.F. Bush, Z. Hall, K. Giles, J. Hoyes, C. V Robinson, B.T. Ruotolo, Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and

- database for gas-phase structural biology, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9557–65. doi:10.1021/ac1022953.
- [82] R.W. Purves, R. Guevremont, Electrospray ionization high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2346–2357. doi:10.1021/ac981380y.
- [83] R. Guevremont, High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry: A new tool for mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1058 (2004) 3–19. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.119.
- [84] C. Uetrecht, R.J. Rose, E. van Duijn, K. Lorenzen, A.J.R. Heck, Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1633–55. doi:10.1039/b914002f.
- [85] A.A. Shvartsburg, K. Tang, R.D. Smith, Understanding and Designing Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry Separations in Gas Mixtures, *Anal. Chem.* 76 (2004) 7366–7374.
- [86] A.A. Shvartsburg, K. Tang, R.D. Smith, Modeling the resolution and sensitivity of FAIMS analyses, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1487–1498. doi:10.1016/j.jasms.2004.06.018.
- [87] R.W. Purves, D. a Barnett, R. Guevremont, Separation of protein conformers using electrospray-high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 197 (2000) 163–177. doi:10.1016/S1387-3806(99)00240-7.
- [88] M. Cui, L. Ding, Z. Mester, Separation of Cisplatin and Its Hydrolysis Products Using Electrospray Ionization High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry Coupled with Ion Trap Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5847–5853. doi:10.1021/ac0344182.
- [89] A.A. Shvartsburg, K. Tang, R.D. Smith, Differential ion mobility separations of peptides with resolving power exceeding 50, *Anal. Chem.* 82 (2010) 32–35. doi:10.1021/ac902133n.
- [90] A.A. Shvartsburg, D.C. Prior, K. Tang, R.D. Smith, High-resolution differential ion mobility separations using planar analyzers at elevated dispersion fields, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7649–7655. doi:10.1021/ac101413k.
- [91] A.A. Shvartsburg, T.A. Seim, W.F. Danielson, R. Norheim, R.J. Moore, G.A. Anderson, u. a., High-definition differential ion mobility spectrometry with resolving power up to 500, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24 (2013) 109–114. doi:10.1007/s13361-012-0517-5.
- [92] D.A. Barnett, B. Ells, R. Guevremont, R.W. Purves, Application of ESI-FAIMS-MS to the Analysis of Tryptic Peptides, *Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 1282–1291.
- [93] B.M. Kolakowski, Z. Mester, Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility

- spectrometry (DMS), *Analyst*. 132 (2007) 842–864. doi:10.1039/b706039d.
- [94] R. Cumeras, E. Figueras, C.E. Davis, J.I. Baumbach, I. Gràcia, Review on ion mobility spectrometry. Part 1: current instrumentation, *Analyst*. 140 (2015) 1376–90. doi:10.1039/c4an01100g.
- [95] J.S. Babis, R.P. Sperline, A.K. Knight, D.A. Jones, C.A. Gresham, M.B. Denton, Performance evaluation of a miniature ion mobility spectrometer drift cell for application in hand-held explosives detection ion mobility spectrometers, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 411–419. doi:10.1007/s00216-009-2818-5.
- [96] E.W. McDaniel, D.W. Martin, W.S. Barnes, Drift tube-mass spectrometer for studies of low-energy ion-molecule reactions, *Rev. Sci. Instrum.* 33 (1962) 2–7. doi:10.1063/1.1717656.
- [97] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, u. a., Molecular Beams of Macroions, *J Chem.Phys.* 49 (1968) 2240–2249. doi:10.1063/1.1670391.
- [98] M. Dole, R.L. Hines, L.L. Mack, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, Gas Phase Macroions, *Macromolecules*. 45 (1968) 96–97.
- [99] J.A. Taraszka, R. Kurulugama, A. Sowell, S.J. Valentine, S.L. Koeniger, R.J. Arnold, u. a., Mapping the Proteome of *Drosophila melanogaster*: Analysis of Embryos and Adult Heads by LC - IMS - MS Methods research articles, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1223–1237.
- [100] C.S. Hoaglund, S.J. Valentine, C.R. Spordeder, J.P. Reilly, D.E. Clemmer, Three-dimensional ion mobility/TOFMS analysis of electrosprayed biomolecules, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2236–2242. doi:10.1021/ac980059c.
- [101] S.J. Valentine, D.E. Clemmer, H/D exchange levels of shape-resolved cytochrome c conformers in the gas phase, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 3558–3566. doi:10.1021/ja9626751.
- [102] R. Richter, P. Schulz-Knappe, M. Schrader, L. Ständker, M. Jürgens, H. Tammen, u. a., Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 726 (1999) 25–35.
- [103] J.A. McLean, D.H. Russell, Sub-femtomole peptide detection in ion mobility-time-of-flight mass spectrometry measurements, *J. Proteome Res.* 2 (2003) 427–430. doi:10.1021/pr034004p.
- [104] B.T. Ruotolo, K.J. Gillig, E.G. Stone, D.H. Russell, K. Fuhrer, M. Gonin, u. a., Analysis of protein mixtures by matrix-assisted laser desorption ionization-ion mobility-orthogonal-time-of-flight mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 219 (2002) 253–267. doi:10.1016/S1387-3806(01)00583-8.
- [105] S. Myung, J.M. Wiseman, S.J. Valentine, R.G. Cooks, D.E. Clemmer, Coupling Desorption Electrospray Ionization with Ion Mobility / Mass Spectrometry for

- Analysis of Protein Structure: Evidence for Desorption of Folded and Denatured States, (2006) 5045–5051.
- [106] G.A. Harris, M. Kwasnik, F.M. Fernandez, Direct Analysis in Real Time Coupled to Multiplexed Drift Tube Ion Mobility Spectrometry for Detecting Toxic Chemicals, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1908–1915.
- [107] H. Borsdorf, M. Rudolph, Gas-phase ion mobility studies of constitutional isomeric hydrocarbons using different ionization techniques, *Int. J. Mass Spectrom.* 208 (2001) 67–72. doi:10.1016/S1387-3806(01)00384-0.
- [108] R. Johnsen, Ion–Molecule Reactions Involving N₂⁺, N⁺, O₂⁺, and O⁺ Ions from 300°K to ~1 eV, *J. Chem. Phys.* 52 (1970) 5080. doi:10.1063/1.1672745.
- [109] R.W. Purves, R. Guevremont, S. Day, C.W. Pipich, M.S. Matyjaszczyk, Mass spectrometric characterization of a high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometer, *Rev. Sci. Instrum.* 69 (1998) 4094. doi:10.1063/1.1149255.
- [110] C. Wu, W.F. Siems, G.R. Asbury, H.H. Hill, Electrospray ionization high-resolution ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4929–4938. doi:10.1021/ac980414z.
- [111] J. Kozole, J.J.R. Stairs, I. Cho, J.D. Harper, S.R. Lukow, R.T. Lareau, u. a., Interfacing an ion mobility spectrometry based explosive trace detector to a triple quadrupole mass spectrometer, *Anal. Bioanal. Chem.* 83 (2011) 8596–8603. doi:10.1021/ac201999a.
- [112] A.A. Shvartsburg, A.J. Creese, R.D. Smith, H.J. Cooper, Separation of peptide isomers with variant modified sites by high-resolution differential ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8327–8334. doi:10.1021/ac101878a.
- [113] S.M. Zucker, S. Lee, N. Webber, S.J. Valentine, J.P. Reilly, D.E. Clemmer, An ion mobility/ion trap/photodissociation instrument for characterization of ion structure, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 1477–1485. doi:10.1007/s13361-011-0179-8.
- [114] E.W. Robinson, D.E. Garcia, R.D. Leib, E.R. Williams, Enhanced mixture analysis of poly(ethylene glycol) using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry combined with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2190–2198. doi:10.1021/ac051709x.
- [115] F. Karasek, S. Kim, S. Rokushika, Plasma chromatography of alkyl amines, *Anal. Chem.* 50 (1978) 2013–2016. doi:10.1021/ac50036a019.
- [116] Z. Karpas, Ion mobility spectrometry of aliphatic and aromatic amines, *Anal. Chem.* 61 (1989) 684–689. doi:10.1021/ac00182a009.
- [117] A.S. Woods, M. Ugarov, T. Egan, J. Koomen, K.J. Gillig, K. Fuhrer, u. a., Lipid/Peptide/Nucleotide Separation with MALDI-Ion Mobility-TOF MS, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2187–2195. doi:10.1021/ac035376k.
- [118] P. Dwivedi, A.J. Schultz, H.H.H. Jr, Metabolic profiling of human blood by high-

- resolution ion mobility mass spectrometry (IM-MS), *Int. J. Mass Spectrom.* 298 (2010) 78–90. doi:10.1016/j.ijms.2010.02.007.
- [119] X. Liu, S.J. Valentine, M.D. Plasencia, S. Trimpin, S. Naylor, D.E. Clemmer, Mapping the human plasma proteome by SCX-LC-IMS-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1249–64. doi:10.1016/j.jasms.2007.04.012.
- [120] E.S. Baker, E.A. Livesay, D.J. Orton, R.J. Moore, W.F. Danielson, D.C. Prior, u. a., An LC-IMS-MS platform providing increased dynamic range for high-throughput proteomic studies, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 997–1006. doi:10.1021/pr900888b.
- [121] E.L. Harry, D.J. Weston, A.W.T. Bristow, I.D. Wilson, C.S. Creaser, An approach to enhancing coverage of the urinary metabolome using liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 871 (2008) 357–361. doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.043.
- [122] C. Eckers, A.M.-F. Laures, K. Giles, H. Major, S. Pringle, Evaluating the utility of ion mobility separation in combination with high-pressure liquid chromatography/mass spectrometry to facilitate detection of trace impurities in formulated drug products, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1255–63. doi:10.1002/rcm.2938.
- [123] A. Malkar, N. a. Devenport, H.J. Martin, P. Patel, M. a. Turner, P. Watson, u. a., Metabolic profiling of human saliva before and after induced physiological stress by ultra-high performance liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry, *Metabolomics.* 9 (2013) 1192–1201. doi:10.1007/s11306-013-0541-x.
- [124] S.J. Valentine, M. Kulchania, C.A.S. Barnes, D.E. Clemmer, Multidimensional separations of complex peptide mixtures: A combined high-performance liquid chromatography/ion mobility/time-of-flight mass spectrometry approach, *Int. J. Mass Spectrom.* 212 (2001) 97–109. doi:10.1016/S1387-3806(01)00511-5.
- [125] X. Liu, M. Plasencia, S. Ragg, S.J. Valentine, D.E. Clemmer, Development of high throughput dispersive LC-ion mobility-TOFMS techniques for analysing the human plasma proteome, *Briefings Funct. genomics proteomics.* 3 (2004) 177–186.
- [126] E. Mason, H.W. Schamp, Mobility of Gaseous Ions in Weak, *Ann. Phys.* 4 (1958) 233–270. doi:10.1016/0003-4916(58)90049-6.
- [127] L. Tao, J.R. McLean, J.A. McLean, D.H. Russell, A collision cross-section database of singly-charged peptide ions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1232–8. doi:10.1016/j.jasms.2007.04.003.
- [128] A.E. Counterman, S.J. Valentine, C.A. Srebalus, S.C. Henderson, C.S. Hoaglund, D.E. Clemmer, High-order structure and dissociation of gaseous peptide aggregates that are hidden in mass spectra, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 743–59. doi:10.1016/S1044-0305(98)00052-X.

- [129] S.J. Valentine, A.E. Counterman, D.E. Clemmer, A database of 660 peptide ion cross sections: use of intrinsic size parameters for bona fide predictions of cross sections, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10 (1999) 1188–211. doi:10.1016/S1044-0305(99)00079-3.
- [130] T. Wyttenbach, G. Von Helden, M.T. Bowers, Gas-Phase Conformation of Biological Molecules : Bradykinin, 7863 (1996) 8355–8364.
- [131] J.C. May, C.R. Goodwin, N.M. Lareau, K.L. Leaptrot, C.B. Morris, R.T. Kurulugama, u. a., Conformational ordering of biomolecules in the gas phase: Nitrogen collision cross sections measured on a prototype high resolution drift tube ion mobility-mass spectrometer, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2107–2116. doi:10.1021/ac4038448.
- [132] E. Jurnecko, J. Kalapothakis, I.D.G. Campuzano, M. Morris, P.E. Barran, Effects of drift gas on collision cross sections of a protein standard in linear drift tube and traveling wave ion mobility mass spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8524–8531. doi:10.1021/ac301260d.
- [133] J. Hofmann, W.B. Struwe, C.A. Scar, J.H. Scrivens, D.J. Harvey, K. Pagel, Estimating collision cross sections of negatively charged N- glycans using traveling wave ion mobility-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10789–10795. doi:10.1021/ac5028353.
- [134] I. Campuzano, M.F. Bush, C. V. Robinson, C. Beaumont, K. Richardson, H. Kim, u. a., Structural characterization of drug-like compounds by ion mobility mass spectrometry: comparison of theoretical and experimentally derived nitrogen collision cross sections, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1026–33. doi:10.1021/ac202625t.
- [135] R.T. Kurulugama, E. Darland, F. Kuhlmann, G. Stafford, J. Fjeldsted, Evaluation of drift gas selection in complex sample analyses using a high performance drift tube ion mobility-QTOF mass spectrometer, *Analyst.* 140 (2015) 6834–6844. doi:10.1039/c5an00991j.
- [136] M. Tswett, Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 24 (1906) 384–393.
- [137] G. Schwedt, C. Vogt, *Analytische Trennmethode*, 1. Aufl., WILEY-VCH, Weinheim, 2010.
- [138] S. Kromidas, *Der HPLC-Experte*, 1. Aufl., WILEY-VCH, Weinheim, 2014.
- [139] A. Cavazzini, F. Gritti, K. Kaczmarek, N. Marchetti, G. Guiochon, Mass-transfer kinetics in a shell packing material for chromatography, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5972–5979. doi:10.1021/ac070571a.
- [140] F. Gritti, G. Guiochon, Comparative study of the performance of columns packed with several new fine silica particles. Would the external roughness of the particles affect column properties?, *J. Chromatogr. A.* 1166 (2007) 30–46. doi:10.1016/j.chroma.2007.06.064.

- [141] K. Camman, Instrumentelle Analytische Chemie - Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung, 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 2001.
- [142] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358–1368. doi:10.1042/bj0351358.
- [143] D.E. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouc, Instrumentelle Analytik - Grundlagen, Geräte, Anwendungen, 6. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
- [144] J.P. Foley, Resolution Equations, *Analyst.* 116 (1991) 1275–1279.
- [145] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271–289.
- [146] M. Otto, Analytische Chemie, 4. Aufl., WILEY-VCH, Weinheim, 2011.
- [147] V. Gonzalez-Ruiz, A.I. Olives, M.A. Martin, Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 17–28. doi:10.1016/j.trac.2014.08.008.
- [148] F. Gritti, G. Guiochon, The current revolution in column technology: How it began, where is it going?, *J. Chromatogr. A.* 1228 (2012) 2–19. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.014.
- [149] S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete, Efficiency of the new sub-2 μ m core-shell (Kinetex) column in practice, applied for small and large molecule separation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 482–490. doi:10.1016/j.jpba.2010.09.021.
- [150] H. Poppe, Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods, *J. Chromatogr. A.* 778 (1997) 3–21. doi:10.1016/S0021-9673(97)00376-2.
- [151] J.C. Giddings, Maximum Number of Components Resolvable by Gel Filtration and Other Elution Chromatographic Methods, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1027–1028. doi:10.1021/ac60252a025.
- [152] G. Vivó-Truyols, S. Van Der Wal, P.J. Schoenmakers, Comprehensive study on the optimization of online two-dimensional liquid chromatographic systems considering losses in theoretical peak capacity in first- and second-dimensions: A pareto-optimality approach, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8525–8536. doi:10.1021/ac101420f.
- [153] J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, T.J. Waeghe, Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time I. Peak capacity limitations, *J. Chromatogr. A.* 857 (1999) 1–20. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00765-7.
- [154] F. Gritti, G. Guiochon, Optimization of the peak capacity per unit time, *J. Chromatogr. A.* 1263 (2012) 125–140. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.040.
- [155] R. Consden, A.H. Gordon, A.J.P. Martin, Qualitative analysis of proteins: a

- partition chromatographic method using paper, *Biochem. J.* 38 (1944) 224–232.
- [156] Z. Liu, S.R. Sirimanne, D.G. Patterson, L.L. Needham, J.B. Phillips, Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the fast separation and determination of pesticides extracted from human serum, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3086–3092. doi:10.1021/ac00091a016.
- [157] J. Dallüge, J. Beens, U.A.T. Brinkman, Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool, *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 69–108. doi:10.1016/S0021-9673(03)00242-5.
- [158] H.-G. Schmarr, S. Ganss, S. Koschinski, U. Fischer, C. Riehle, J. Kinnart, u. a., Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography–mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 6769–6777. doi:10.1016/j.chroma.2010.06.049.
- [159] R. van der Westhuizen, R. Crous, A. de Villiers, P. Sandra, Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of Fischer-Tropsch oil products, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 8334–8339. doi:10.1016/j.chroma.2010.10.099.
- [160] V. Elsner, S. Laun, D. Melchior, M. Köhler, O.J. Schmitz, Analysis of fatty alcohol derivatives with comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1268 (2012) 22–28. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.072.
- [161] P. Dugo, T. Kumm, B. Chiofalo, A. Cotroneo, L. Mondello, Separation of triacylglycerols in a complex lipidic matrix by using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1146–1154. doi:10.1002/jssc.200500476.
- [162] M. Kivilompolo, T. Hyötyläinen, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids, *J. Chromatogr. A.* 1145 (2007) 155–164. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.090.
- [163] R.H. Lindberg, G. Fedorova, K.M. Blum, J. Pulit-Prociak, A. Gillman, J. Järhult, u. a., Online solid phase extraction liquid chromatography using bonded zwitterionic stationary phases and tandem mass spectrometry for rapid environmental trace analysis of highly polar hydrophilic compounds - Application for the antiviral drug Zanamivir, *Talanta.* 141 (2015) 164–169. doi:10.1016/j.talanta.2015.03.066.
- [164] A.L. Heffernan, K. Thompson, G. Eaglesham, S. Vijayasathya, J.F. Mueller, P.D. Sly, u. a., Rapid, automated online SPE-LC-QTRAP-MS/MS method for the simultaneous analysis of 14 phthalate metabolites and 5 bisphenol analogues in human urine, *Talanta.* 151 (2016) 224–233.

doi:10.1016/j.talanta.2016.01.037.

- [165] L. Tretzel, A. Thomas, T. Piper, M. Hedeland, H. Geyer, W. Schänzer, u. a., Fully automated determination of nicotine and its major metabolites in whole blood by means of a DBS online-SPE LC-HR-MS/MS approach for sports drug testing, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 123 (2016) 132–140. doi:10.1016/j.jpba.2016.02.009.
- [166] G. Schwedt, *Analytische Chemie - Grundlagen, Methoden und Praxis*, 2. Aufl., WILEY-VCH, Weinheim, 2008.
- [167] S.A. Cohen, M.R. Schure, *Multidimensional liquid chromatography*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2008.
- [168] J.F.K. Huber, R. van der Linden, E. Ecker, M. Oreans, Column switching in high-pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 83 (1973) 267–277.
- [169] D.H. Freeman, Review: Ultrasensitivity through Column Switching and Mode Sequencing, *Anal. Chem.* 53 (1981) 2–5.
- [170] F.W. Willmott, I. Mackenzie, R.J. Dolphin, Microcomputer-controlled column switching system for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 167 (1978) 31–39.
- [171] C. Lee, J. Zang, J. Cuff, N. McGachy, T.K. Natishan, C.J. Welch, u. a., Application of Heart-Cutting 2D-LC for the Determination of Peak Purity for a Chiral Pharmaceutical Compound by HPLC, *Chromatographia*. 76 (2013) 5–11. doi:10.1007/s10337-012-2367-5.
- [172] E. Naegele, Detection of impurities by heart cutting using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, Agilent Technologies Application Note 5991-0834EN, (2012).
- [173] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, Implementations of two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 1189 (2008) 109–168. doi:10.1016/j.chroma.2008.01.086.
- [174] D. Li, C. Jakob, O. Schmitz, Practical considerations in comprehensive two-dimensional liquid chromatography systems (LCxLC) with reversed-phases in both dimensions, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2014) 153–167. doi:10.1007/s00216-014-8179-8.
- [175] P. De La Mata, J.J. Harynuk, Limits of detection and quantification in comprehensive multidimensional separations. 1. A theoretical look, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6646–6653. doi:10.1021/ac3010204.
- [176] D.F. Thekkudan, S.C. Rutan, P.W. Carr, A study of the precision and accuracy of peak quantification in comprehensive two-dimensional liquid chromatography in time, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 4313–4327. doi:10.1016/j.chroma.2010.04.039.
- [177] F. Erni, R.W. Frei, Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 561–569.

- [178] M.M. Bushey, J.W. Jorgenson, Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins, *Anal. Chem.* 62 (1990) 161–167.
- [179] P.J. Marriott, Z. Wu, P. Schoenmakers, Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography - an update, *LCGC Eur.* 25 (2012).
- [180] C.R. Evans, J.W. Jorgenson, Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1952–1961. doi:10.1007/s00216-004-2516-2.
- [181] J. Pól, T. Hyötyläinen, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* (2008) 21–31. doi:10.1007/s00216-008-1879-1.
- [182] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1585–1594. doi:10.1021/ac971184b.
- [183] J. V. Seeley, Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography, *J. Chromatogr. A.* 962 (2002) 21–27. doi:10.1016/S0021-9673(02)00461-2.
- [184] D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1168 (2007) 3–43. doi:10.1016/j.chroma.2007.08.054.
- [185] R. Dück, Einsatz der komprehensiven zweidimensionalen Flüssigchromatographie zur Analyse von Naturstoffen und die Entwicklung der Recycling Chromatographie zur Trennung chiraler Verbindungen, Dissertation, Bergische Universität Wuppertal, 2012. <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:468-20121106-123208-2>.
- [186] Y. Huang, H. Gu, M. Filgueira, P.W. Carr, An experimental study of sampling time effects on the resolving power of on-line two-dimensional high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2984–2994. doi:10.1016/j.chroma.2011.03.032.
- [187] G. Guiochon, L.A. Beaver, M.F. Gonnord, A.M. Siouffi, M. Zakaria, Theoretical investigation of the potentialities of the use of a multidimensional column in chromatography, *J. Chromatogr. A.* 255 (1983) 415–437. doi:10.1016/S0021-9673(01)88298-4.
- [188] J.C. Giddings, Two-dimensional separations: concept and promise., *Anal. Chem.* 56 (1984) 1258A–1270A. doi:10.1021/ac00276a003.
- [189] J.C. Giddings, Sample dimensionality: a predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation, *J. Chromatogr. A.* 703 (1995) 3–15.
- [190] Z. Liu, D. Patterson Jr, Geometric approach to factor analysis for the estimation

- of orthogonality and practical peak capacity in comprehensive two-dimensional separations, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3840–3845. doi:10.1021/ac00117a004.
- [191] M. Gilar, P. Olivova, A.E. Daly, J.C. Gebler, Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6426–6434. doi:10.1021/ac050923i.
- [192] F. Bedani, W.T. Kok, H.G. Janssen, Optimal gradient operation in comprehensive liquid chromatography x liquid chromatography systems with limited orthogonality, *Anal. Chim. Acta.* 654 (2009) 77–84. doi:10.1016/j.aca.2009.06.042.
- [193] R. Dück, H. Sonderfeld, O.J. Schmitz, A simple method for the determination of peak distribution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1246 (2012) 69–75. doi:10.1016/j.chroma.2012.02.038.
- [194] K. Horie, H. Kimura, T. Ikegami, A. Iwatsuka, N. Saad, O. Fiehn, u. a., Calculating optimal modulation periods to maximize the peak capacity in two-dimensional HPLC, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3764–3770. doi:10.1021/ac062002t.
- [195] J.M. Davis, D.R. Stoll, P.W. Carr, Effect of First-Dimension Undersampling on Effective Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations, *Anal. Chem.* 80 (2008) 461–473. doi:10.1021/ac800933z.
- [196] Dwight R. Stoll, X. Wang, P.W. Carr, Comparison of the Practical Resolving Power of One- and Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Metabolomic Samples, *Anal. Chem.* 80 (2008) 268–278. doi:10.1016/j.chroma.2007.06.074.
- [197] G.J. Opiteck, J.W. Jorgenson, Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2283–91. doi:10.1021/ac961156d.
- [198] G.J. Opiteck, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, C. Hill, N. Carolina, R.J. Anderegg, Comprehensive On-Line LC / LC / MS of Proteins, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1518–1524.
- [199] J. Pol, B. Hohnova, T. Hyötyläinen, Characterisation of Stevia Rebaudiana by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1150 (2007) 85–92. doi:10.1016/j.chroma.2006.09.008.
- [200] B. Peng, R. Ahrends, Adaptation of Skyline for Targeted Lipidomics, *J. Proteome Res.* 15 (2016) 291–301. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00841.
- [201] Agilent Technologies, G2582A Drift Gas Upgrade Kit (Quick Start Guide), (2015).
- [202] L. Taylor, S. Tichy, Ion mobility technology for LC / MS reveal greater detail, (2013). [http://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Ion_Separation - Innovations in Mobility Techniques.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Ion_Separation_-_Innovations_in_Mobility_Techniques.pdf) (zugegriffen 22. Januar 2016).

- [203] J.A. McLean, The Mass-Mobility Correlation Redux: The Conformational Landscape of Anhydrous Biomolecules, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 1775–1781. doi:10.1016/j.jasms.2009.06.016.
- [204] S. Trimpin, B. Tan, B.C. Bohrer, D.K. O'Dell, S.I. Merenbloom, M.X. Pazos, u. a., Profiling of phospholipids and related lipid structures using multidimensional ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 287 (2009) 58–69. doi:10.1016/j.ijms.2008.12.020.
- [205] S.N. Jackson, M. Ugarov, J.D. Post, T. Egan, D. Langlais, J.A. Schultz, u. a., A Study of Phospholipids by Ion Mobility TOFMS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1655–1662. doi:10.1016/j.jasms.2008.07.005.
- [206] A.A. Shvartsburg, G. Isaac, N. Leveque, R.D. Smith, T.O. Metz, Separation and classification of lipids using differential ion mobility spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 1146–1155. doi:10.1007/s13361-011-0114-z.
- [207] T.J. Causon, S. Hann, Theoretical evaluation of peak capacity improvements by use of liquid chromatography combined with drift tube ion mobility-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1416 (2015) 47–56. doi:10.1016/j.chroma.2015.09.009.
- [208] P.M. Lalli, B. a. Iglesias, H.E. Toma, G.F. De Sa, R.J. Daroda, J.C. Silva Filho, u. a., Protomers: Formation, separation and characterization via travelling wave ion mobility mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 712–719. doi:10.1002/jms.2999.
- [209] C. Laphorn, T.J. Dines, B.Z. Chowdhry, G.L. Perkins, F.S. Pullen, Can ion mobility mass spectrometry and density functional theory help elucidate protonation sites in „small“ molecules?, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 2399–2410. doi:10.1002/rcm.6700.
- [210] Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränkeverordnung vom 24. Mai 2004 (BGBl. I S. 1016), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 30. Juni 2015 (BGBl. I S. 1090) geändert worden ist, (2004).
- [211] Leitsätze für Fruchtsäfte, Neufassung vom 27. November 2002 (BANz. Nr. 46b vom 7. März 2003, GMBI 2003 S. 151), geändert durch die Bekanntmachung vom 07. Januar 2015 (BANz. AT vom 27.01.2015 B1, GMBI 2015 S. 113), (2002).
- [212] H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 6. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008.
- [213] M.K. Khan, Zill-E-Huma, O. Dangles, A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols, *J. Food Compos. Anal.* 33 (2014) 85–104. doi:10.1016/j.jfca.2013.11.004.
- [214] G. Gattuso, D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi, C. Caristi, Flavonoid composition of citrus juices, *Molecules.* 12 (2007) 1641–1673. doi:10.3390/12081641.

- [215] M.F. Mesleh, J.M. Hunter, A.A. Shvartsburg, G.C. Schatz, M.F. Jarrold, Structural Information from Ion Mobility Measurements: Effects of the Long-Range Potential, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 16082–16086.
- [216] A. Baldi, R.T. Rosen, E.K. Fukuda, C.T. Ho, Identification of nonvolatile components in lemon peel by high-performance liquid chromatography with confirmation by mass spectrometry and diode-array detection, *J. Chromatogr. A* 718 (1995) 89–97. doi:10.1016/0021-9673(95)00676-1.
- [217] C.A. Ledesma-Escobar, F. Priego-Capote, M.D. Luque De Castro, Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 1196–1205. doi:10.1002/jms.3637.
- [218] Thomas Kreutzig, *Kurzlehrbuch Biochemie*, 11. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München - Jena, 2002.
- [219] S.W. Souci, W. Fachmann, H. Kraut, *Der kleine Souci-Fachmann-Kraut - Lebensmitteltabellen für die Praxis*, 4. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009.
- [220] R. Plumb, J. Granger, C. Stumpf, I.D. Wilson, J. a Evans, E.M. Lenz, Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences., *Analyst*. 128 (2003) 819–823. doi:10.1039/b304296k.
- [221] N. Gray, M.R. Lewis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, High-throughput microbore UPLC-MS metabolic phenotyping of urine for large-scale epidemiology studies, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 2714–2721. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00203.
- [222] A. Bajoub, T. Pacchiarotta, E. Hurtado-Fernandez, L. Olmo-Garcia, R. Garcia-Villalba, A. Fernandez-Gutierrez, u. a., Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: A botanical classification perspective, *J. Chromatogr. A* 1428 (2016) 267–279. doi:10.1016/j.chroma.2015.10.059.
- [223] M. Otto, *Chemometrie - Statistik und Computereinsatz in der Analytik*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1997.
- [224] Waltraud Kessler, *Multivariate Datenanalyse*, WILEY-VCH, Weinheim, 2007.
- [225] BGA/BfArM Monographie vom 23.4.1987, Heftnummer 76, ATC-Code: R07AX, (1987).
- [226] Anton Curic, Hildegard von Bingen - Heilige und Heilerin, H+L Verlag, Köln, 1998.
- [227] A.M. Pahlow, *Das große Buch der Heilpflanzen*, Weltbild Verlag, Augsburg, 2000.
- [228] C.A. Calliste, P. Trouillas, D.P. Allais, J.L. Duroux, *Castanea sativa* Mill. leaves

- as new sources of natural antioxidant: An electronic spin resonance study, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 282–288. doi:10.1021/jf049341c.
- [229] I.F. Almeida, P.C. Costa, M.F. Bahia, Evaluation of functional stability and batch-to-batch reproducibility of a *Castanea sativa* leaf extract with antioxidant activity., *AAPS PharmSciTech.* 11 (2010) 120–125. doi:10.1208/s12249-009-9360-9.
- [230] C.L. Quave, J.T. Lyles, J.S. Kavanaugh, K. Nelson, C.P. Parlet, H. a. Crosby, u. a., *Castanea sativa* (European Chestnut) Leaf Extracts Rich in Ursene and Oleanene Derivatives Block *Staphylococcus aureus* Virulence and Pathogenesis without Detectable Resistance, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0136486.
- [231] W. Frede, *Handbuch für Lebensmittelchemiker*, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010.
- [232] J. Walczak, S. Bocian, B. Buszewski, Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Phosphatidylcholine Analysis in Egg Yolk, *Food Anal. Methods.* (2014) 661–667. doi:10.1007/s12161-014-9942-3.
- [233] Y.-Y. Zhao, Y. Xiong, J.M. Curtis, Measurement of phospholipids by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: the determination of choline containing compounds in foods., *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5470–5479. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.025.
- [234] S. Stephan, C. Jakob, J. Hippler, O.J. Schmitz, A novel four-dimensional analytical approach for analysis of complex samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 3751–3759. doi:10.1007/s00216-016-9460-9.
- [235] P.J. Schoenmakers, G. Vivó-Truyols, W.M.C. Decrop, A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems., *J. Chromatogr. A.* 1120 (2006) 282–90. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.039.
- [236] R.A. Shellie, P.R. Haddad, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 405–415. doi:10.1007/s00216-006-0516-0.
- [237] D.R. Stoll, E.S. Talus, D.C. Harmes, K. Zhang, Evaluation of detection sensitivity in comprehensive two-dimensional liquid chromatography separations of an active pharmaceutical ingredient and its degradants, *Anal. Bioanal. Chem.* (2014) 265–277. doi:10.1007/s00216-014-8036-9.
- [238] M. Filgueira, Y. Huang, K. Witt, C. Castells, P.W. Carr, Improving peak capacity in fast on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography with post first dimension flow-splitting, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9531–9539. doi:10.1021/ac202317m.
- [239] D. Li, O.J. Schmitz, Use of shift gradient in the second dimension to improve the separation space in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 6511–6517.

doi:10.1007/s00216-013-7089-5.

- [240] X.-G. Liu, S.-Q. Wu, P. Li, H. Yang, Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in Ginkgo biloba, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 212–225. doi:10.1016/j.jpba.2015.03.006.
- [241] S. Ding, E. Dudley, S. Plummer, J. Tang, R.P. Newton, G. Brenton, Quantitative determination of major active components in Ginkgo biloba dietary supplements by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2753–2760. doi:10.1002/rcm.
- [242] M. Hilton, E. Stuart, Ginkgo biloba for tinnitus, *Cochrane database Syst. Rev.* (2004) CD003852. doi:10.1002/14651858.CD003852.pub3.
- [243] W. Li, J.F. Fitzloff, HPLC determination of flavonoids and terpene lactones in commercial ginkgo biloba products, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25 (2002) 2501–2514. doi:10.1081/JLC-120014270.
- [244] H. Xie, J.R. Wang, L.F. Yau, Y. Liu, L. Liu, Q. Bin Han, u. a., Catechins and procyanidins of ginkgo biloba show potent activities towards the inhibition of β -amyloid peptide aggregation and destabilization of preformed fibrils, *Molecules.* 19 (2014) 5119–5134. doi:10.3390/molecules19045119.
- [245] M. Krauss, H. Singer, J. Hollender, LC – high resolution MS in environmental analysis : from target screening to the identification of unknowns, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 943–951. doi:10.1007/s00216-010-3608-9.
- [246] F. Hernández, M. Ibáñez, R. Bade, L. Bijlsma, J. V Sancho, Trends in Analytical Chemistry Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 140–157. doi:10.1016/j.trac.2014.08.003.
- [247] E. Gracia-lor, J. V Sancho, R. Serrano, F. Hernández, Chemosphere Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia, *Chemosphere.* 87 (2012) 453–462. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.025.
- [248] A. Mendoza, J. Aceña, S. Pérez, M.L. De Alda, D. Barceló, A. Gil, Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital waste- water : A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard, *Environ. Res.* 140 (2015) 225–241. doi:10.1016/j.envres.2015.04.003.
- [249] J. Nurmi, J. Pellinen, Multiresidue method for the analysis of emerging contaminants in wastewater by ultra performance liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6712–6719. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.071.
- [250] R. Loos, B.M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, G. Bidoglio, EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters, *Environ. Pollut.* 157 (2015) 561–568. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.020.

- [251] M. Ruff, M.S. Mueller, M. Loos, H.P. Singer, Quantitative target and systematic non-target analysis of polar organic micro-pollutants along the river Rhine using high-resolution mass-spectrometry - Identification of unknown sources and compounds, *Water Res.* 87 (2015) 145–154. doi:10.1016/j.watres.2015.09.017.
- [252] J. Leonhardt, T. Teutenberg, J. Tuerk, M.P. Schluesener, T.A. Ternes, T.C. Schmidt, Analytical Methods two-dimensional liquid chromatographic approaches coupled to high resolution mass spectrometry for the analysis of complex samples, *Anal. Methods.* 7 (2015) 7697–7706. doi:10.1039/C5AY01143D.
- [253] H.-G. Schmarr, J. Bernhardt, Profiling analysis of volatile compounds from fruits using comprehensive two-dimensional gas chromatography and image processing techniques, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 565–574. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.063.
- [254] P.Q. Tranchida, G. Purcaro, M. Maimone, L. Mondello, Impact of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry on food analysis, *J. Sep. Sci.* 39 (2015) n/a–n/a. doi:10.1002/jssc.201500379.
- [255] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC). I. Introduction and instrumental set-up, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 438–454. doi:10.1016/j.trac.2006.03.002.
- [256] M. Baim, H.H. Hill Jr., Tunable selective detection for capillary gas chromatography by ion mobility monitoring, *Anal. Chem.* 54 (1982) 38–43. doi:10.1021/ac00238a013.
- [257] M. Baim, R. Eatherton, H.H. Hill Jr., Ion mobility detector for gas chromatography with a direct photoionization source, *Anal. Chem.* (1983) 1761–1766. doi:10.1021/ac00261a026.
- [258] A.B. Kanu, C. Wu, H.H. Hill, Rapid preseparation of interferences for ion mobility spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 610 (2008) 125–134. doi:10.1016/j.aca.2007.08.024.
- [259] M.A. Molina, W. Zhao, S. Sankaran, M. Schivo, N.J. Kenyon, C.E. Davis, Design-of-experiment optimization of exhaled breath condensate analysis using a miniature differential mobility spectrometer (DMS), *Anal. Chim. Acta.* 628 (2008) 155–161. doi:10.1016/j.aca.2008.09.010.
- [260] T. Limero, E. Reese, R. Peters, J. James, A Second Generation Volatile Organic Analyzer for the International Space Station, *Tech. Pap.* 1999-01-20 (1999). doi:doi:10.4271/1999-01-2059.
- [261] U. Telgheder, M. Malinowski, M.A. Jochmann, Determination of volatile organic compounds by solid-phase microextraction—gas chromatography-differential mobility spectrometry, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 12 (2009) 123–130. doi:10.1007/s12127-009-0032-y.
- [262] S.B. Mohsin, D. Wong, F.R. Ley, GC-APCI IMS of Diesel, Agilent Technologies

Application Note 5991-5856EN, (2015).

- [263] S.G. Christina L. Crawford, M. Gonin, K. Fuhrer, X. Zhang, H.H.J. Hill, The novel use of gas chromatography-ion mobility-time of flight mass spectrometry with secondary electrospray ionization for complex mixture analysis, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 14 (2011) 23–30.
- [264] A. Steinhäuser, Variation der Modulationszeiten in der GCxGC, Masterthesis, Universität Duisburg-Essen, 2014.

Publikationsliste

Publikationen

[1] S. Stephan, C. Jakob, J. Hippler, O.J. Schmitz, A novel four-dimensional analytical approach for analysis of complex samples, *Anal. Bioanal. Chem.* (2016). doi:10.1007/s00216-016-9460-9.

[2] A.J. Li, O.J. Schmitz, S. Stephan, C. Lenzen, P.Y.-K. Yue, K. Li, u. a., Photocatalytic transformation of acesulfame: Transformation products identification and embryotoxicity study., *Water Res.* 89 (2015) 68–75. doi:10.1016/j.watres.2015.11.035.

[3] L. Hyzak, S. Giese, H.-W. Kling, V. Wulf, D. Melchior, M. Köhler, u. a., Improvements to the compressed-sample (CS) technique for MALDI-TOF mass spectrometry., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1417–24. doi:10.1007/s00216-012-6529-y.

Poster und Vorträge

48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), März 2015, Wuppertal, Teilnahme mit Vortrag „Analyse von Fruchtsäften mit CE-IM-qTOF-MS und HPLC-IM-qTOF-MS“

26. Doktorandenseminar des Arbeitskreises Separation Science der GDCh-Fachgruppe Analytische Chemie, Januar 2016, Hohenroda, Teilnahme mit Vortrag „Development of a continuous multiheart-cutting LC-system (LC+LC) for coupling to an IM-qTOF-MS“

ANAKON, März 2015, Graz, Teilnahme mit Posterbeitrag “Analysis of fruit juice samples with HPLC and CE coupled to IM-qTOF-”

63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Juni 2015, St. Louis (USA), Teilnahme mit Posterbeitrag “Analysis of fruit juice samples with CE-IM-qTOF-MS and HPLC-IM-qTOF-MS”

Analytica Conference, Mai 2016, München, Teilnahme mit Posterbeitrag „Development of a continuous multiheart-cutting LC-System (LC+LC) for coupling to an IM-qTOF-MS“

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen
des Datenschutzes nicht enthalten.